217

ACCIONES ANTIARRITMICAS Y CARDIOINHIBITORIAS DE UN DIALIZADO DE AJO EN AURICULAS AISLADAS DE RATA. (Antiarritmic and cardioinhibitory effects of garlic (Allium sativum) dialysate on rat atria). N. Martín, L. Bardisa, C. Pantoja, R. Román, M. Vargas y P. Quezada. Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

Para estudiar los efectos de un dializado de ajo sobre la actividad cardíaca se administró éste en dosis crecientes a preparaciones separadas de aurículas aisladas de rata. La aurícula izquierda fue estimulada eléctricamente y la tensión desarrollada registrada mediante un transductor FT-03 conectado a un Grass 79B. La frecuencia de la aurícula derecha que latía espontáneamente fue registrada en un Harvard 350.

La administración simultánea de dosis acumulativas del dializado de ajo (0.1 a 3.5 mg/ml) a ambas aurículas, produjo efectos inótropos negativos y bradicardia en forma dosis-dependiente, respectivamente. La DI_{50} para la tensión fue de 1.54 mg/ml y para la frecuencia de 0.74 mg/ml. En otro grupo de experimentos, la aurícula izquierda a la que se indujo una arritmia ectópica, retornó progresivamente al ritmo eléctricamente generado, después de la administración en el baño de dosis crecientes del dializado de ajo. La arritmia desencadenada en la aurícula derecha por el isoproterenol (10^{-5}M) fue también corregida por esta metódica. Cuando ambas preparaciones fueron incubadas previamente por 5 min con una concentración de 0.920 mg/ml de dializado, la administración de la dosis del isoproterenol que inducía la arritmia fue ineficaz para producirla.

Del presente estudio se concluye que este dializado de ajo presenta propiedades depresoras tanto sobre la tensión desarrollada por la aurícula izquierda de rata como sobre la frecuencia espontánea de la aurícula derecha. Este compuesto presenta además en este preparación una actividad antiarrítmica tanto preventiva como curativa.

Proyectos: Fondecyt 89-524; D.I.(U.de C.). 20.33.51.

BIOQUIMICA

218

AISLAMIENTO DE TRANSFORMANTES INVASORES A PARTIR DE UNA GENOTECA DE *Renibacterium salmoninarum*. (Isolation of invasive transformants from a genomic library of *Renibacterium salmoninarum*).

Maulén, N., Aruti, D., Poblete, A. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia. (Patrocinio: G.León).

La enfermedad bacteriana del riñón (Bacterial kidney disease, BKD), se caracteriza entre otros aspectos, porque el agente causal, *Renibacterium salmoninarum*, es un patógeno intracelular. Se conoce una gran variedad de microorganismos que penetran y sobreviven dentro de la célula huésped. Estudios relativamente recientes han comenzado a establecer las bases genéticas y moleculares que median la invasividad de algunas especies bacterianas, habiéndose identificado proteínas codificadas por el genoma bacteriano que determinan su capacidad invasora. En el caso del agente causal de BKD, estos mecanismos son aún desconocidos. En este trabajo se optimizó un test de invasividad para *R.salmoninarum* en cultivo en monocapa de células CHSE. La identificación de la bacteria en el interior de las células se realizó por medio de la técnica de inmunoflurescencia indirecta, utilizando para ello un antisuero de conejo anti *R.salmoninarum*, como primer anticuerpo y como segundo anticuerpo se usó anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado con FITC. Paralelamente, cultivos de células CHSE infectadas fueron fijadas para microscopía electrónica convencional, lo que aseguró inequívocamente la ubicación intracelular de la bacteria. Con el objeto de identificar algún(os) recombinante(s) que putativamente pudieran contener secuencia(s) responsable(s) de la capacidad invasora de *R.salmoninarum*, se utilizó el mismo tipo de ensayo con mezclas de transformantes (*E.coli* HB101) de una genoteca de este microorganismo construída en pBR322. En este caso la identificación de las bacterias intracelulares por IFAT, se realizó utilizando como primer anticuerpo IgG de conejo anti *E.coli* HB101. De las mezclas putativamente invasoras, se examinó cada transformante en experimentos individuales de invasividad. De éstos, se ha seleccionado al menos diez recombinantes que tendrían secuencia(s) génica(s) del agente causal de BKD comprometidas en invasividad. Actualmente se está realizando estudios de microscopía electrónica de transmisión, a fin de confirmar su ubicación intracelular. (Financiado por Proyecto Fondecyt 120/89 y por DIC-UACH).

219

DETECCION DE LA ENFERMEDAD BACTERIANA DEL RIÑON MEDIANTE HIBRIDACION in situ. (Bacterial kidney disease detection by in situ hybridization).

Etchegaray, J.P., Martínez, M.A., León G. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

En nuestro laboratorio se seleccionó tres sondas específicas que representan secuencias que distinguen al genoma de *Renibacterium salmoninarum*, microorganismo responsable de la enfermedad bacteriana del riñón (BKD) en especies salmonídeas. A fin de optimizar un sistema de hibridación in situ para la identificación de secuencias de DNA de *R.salmoninarum*, se utilizó las sondas marcadas con fotobiotina en extendidos de distintas cepas bacterianas. Asegurada la absoluta especificidad de las sondas frente a *R.salmoninarum*, se utilizó una de ellas, (pMAM29) en ensayos de hibridación con extendidos de tejido renal proveniente de salmones enfermos de BKD. Estos habían sido diagnosticados clínicamente y confirmados por la técnica de inmunoflurescencia indirecta (IFAT). Sin embargo, la hibridación molecular confirmó su mayor sensibilidad, ya que muestras de tejido renal de salmón, utilizadas como control negativo, no sólo mediante la tinción de Gram, sino también por IFAT, resultaron positivas por el método de hibridación in situ. En razón del pequeño tamaño de las secuencias únicas (la mayor de 154pb), se utilizó dos de ellas como sondas (pMAM29 y pMAM77) con las cuales se logró aislar alrededor de 20 clones específicos más grandes, a partir de una genoteca de *R.salmoninarum*. Esto permitirá además, montar con mayor certeza un procedimiento de detección de esta enfermedad basado en la técnica de PCR. Para ello, en una primera etapa, se ha utilizado el clon pMAM29, del cual se cuenta con los dos oligonucleótidos partidores. Al momento, se ha optimizado la reacción de amplificación del inserto de *R.salmoninarum* contenido en el DNA de pMAM29. Por otra parte, y en forma preliminar, utilizando altas cantidades de DNA de la bacteria, se ha logrado obtener la amplificación del mismo segmento génico. Los resultados obtenidos demuestran que este procedimiento podrá servir no sólo como instrumento diagnóstico simple para la enfermedad bacteriana del riñón, sino también para la detección de individuos portadores de la patología. (Financiado por Proyecto Fondecyt 120/89., por IFS 1779-1 y por la DIC-UACH)

220

ACTIVIDAD RNA POLIMERASICA EN HEPATOCITOS DE CARPA ACLIMATIZADAS A INVIERNO. (RNA polymerase activity in hepatocytes of winter acclimatized carp). **Norambuena,L., Vera,M.I., Krauskopf,M. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile**

Anteriormente hemos demostrado que existen notables diferencias en la citoarquitectura de las células hepáticas de carpas aclimatizadas a verano e invierno. Entre ellas, el nucléolo de hepatocitos de peces adaptados a invierno aparece con sus componentes disgregados mientras que en verano se observan entremezclados. Esta situación, junto con una disminución en la cantidad de RNA ribosomal en la estación invernal, nos ha llevado a postular que la transcripción de rRNA estaría regulada como parte de una respuesta compensatoria a los cambios estacionales que experimenta el medio ambiente de este ectotermo euritermal.

La primera etapa del presente trabajo ha tenido por objeto la determinación de la actividad RNA polimerásica en núcleos aislados de hepatocitos de carpas aclimatizadas a invierno. Se prepararon núcleos de hepatocitos y se realizaron experimentos de transcripción. La actividad se midió como incorporación de ^{3}H-UTP en material ácido insoluble. Se determinó actividad RNA polimerásica total y aquella atribuible a RNA pol I (insensible a alfa-amanitina). Los ensayos se realizaron a 10 y 20°C, que corresponden a las temperaturas del agua en invierno y verano, respectivamente.

Los resultados indican que un incremento de 10°C en la temperatura de ensayo, aumenta la velocidad inicial de la actividad RNA polimerásica total (Q_{10}=3,1). No fue posible medir velocidad inicial en la actividad de la pol I, ya que rápidamente (30 seg) la enzima alcanzó su máxima velocidad, sin diferencias significativas entre las medidas a 10 y 20°C. Este resultado indicaría que la RNA pol I que está "unida" a DNA ribosomal terminaría de elongar cadenas cuya transcripción había comenzado antes del aislamiento de los núcleos y que estos eventos de elongación serían escasos durante la estación invernal, lo que significaría que la cantidad de enzima "unida" a DNA sería muy baja. (FONDECYT 0007/90, 905/91, DI UACH S-90-15).

221

Inducción de vitelogenina y receptores hepáticos de estrógeno durante la aclimatización de *Cyprinus carpio*.(Vitelogenin induction and estrogen receptors during the acclimatization of *Cyprinus carpio*) I. Hernández, M. Concha, R. Pessot*, and R. Amthauer. Instituto de Bioquímica and Instituto de Economía Agraria*, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

La carpa (*C. carpio*) , como todos los ectotermos , ha desarrollado complejas respuestas compensatorias a los cambios de su habitat. Cíclicamente debe adaptarse a las características físicas de cada estación, *i.e.* temperatura y fotoperíodo, para lo cual se reprograma tanto molecularmente como fisiológicamente. Hemos postulado que la adaptación reversible que caracteriza al proceso de aclimatización implica conmutaciones en la expresión génica .

En la búsqueda de productos de transcripción regulados por RNA pol II que, por estar sometidos a control estacional puedan servir de modelo para estudiar la naturaleza molecular de su regulación, examinamos la inducción de vitelogenina por beta-estradiol en carpas macho, tanto en invierno como en verano. Los resultados obtenidos demuestran que la proteína se induce prontamente en peces aclimatizados a la estación cálida, y que en cambio, las carpas de invierno esencialmente no responden a la inducción. Es de interés que las carpas aclimatadas a temperaturas bajas con un fotoperíodo de 12 h responden débilmente (en cerca de tres semanas posterior a la inducción).

Para explicarnos este hallazgo, postulamos que la diferencia detectada pudiera tener su origen en la capacidad de la hormona para unirse a sus receptores o en la cantidad de éstos, por un control de su expresión. Al investigar los receptores hepáticos de beta estradiol, en ambas, carpas aclimatizadas a invierno y verano, identificamos algunas diferencias significativas en la K_d tanto en receptores nucleares como citoplasmáticos al ser tratados con la hormona. Actualmente se está realizando un análisis exhaustivo desde el punto de vista estadístico para interpretar las variables identificadas en cuanto a K_d y número de receptores en ambos compartimientos celulares, en peces tratados con la hormona y sus controles correspondientes. (Financiado por FONDECYT 905/91, DIC-UACh y OEA).

222

RNA EN EL NUCLEO DE ESPERMATOZOIDE DE DISTINTOS ORGANISMOS. EVIDENCIA DE snRNP NATIVOS.(RNA in the sperm nucleus of different organisms. Evidence for native snRNP). Delgado, F. y Pessot, C. Instituto de Bioquimica, Universidad Austral de Chile. (Patrocinio: Luis O. Burzio).

Experimentos *in vivo* de incorporación de 3H-uridina en testículo de rata demostraron que los RNA que se encuentran en el núcleo de espermatozoide habrían sido sintetizados probablemente antes de la segunda división meiótica. Análisis electroforético del RNA marcado extraído de espermatozoides, presentó bandas discretas que migraron como U-RNAs. Con el objeto de demostrar la universalidad de este hallazgo se extrajo RNA de espermatozoides de distintos organismos, entre ellos: mamíferos, aves, peces, moluscos, etc. Análisis electroforético de dichos RNAs mostró perfiles similares. En el caso de espermatozoides de moluscos se demostró por análisis de "Northern blot" la presencia de al menos RNAs U5 y U6. Mediante el uso de anticuerpos anti-Sm de pacientes con lupus eritematoso, se demostró por análisis de "Western blot", la presencia de algunas proteínas asociadas a los RNAs en los organismos ya citados.

Se diseñó además una estrategia para demostrar que los U-RNAs y las proteínas asociadas están formando complejos snRNP nativos en el núcleo de espermatozoide. Los complejos ribonucleoproteicos separados por electroforesis nativa en una primera dimensión confirmaron la presencia de U-RNAs y las proteínas asociadas por análisis de "Northern blot" y "Western blot" en una segunda dimensión, respectivamente. Se discutirá la importancia de la existencia de estos complejos en el espermatozoide. (DID-UACH, FONDECYT 0063-90, STIFTUNG VOLKSWAGENWERK I-65 516).

223

RNA β_2 MICROGLOBULINA EN NUCLEO DE ESPERMATOZOIDE DE RATON Y SU POSIBLE ROL EN EMBRIOGENESIS TEMPRANA. (β_2 Microglobulin RNA in the sperm head and possible function in early embryogenesis in mouse). LERAM, P., Zamora, P. Y BURZIO, L.O. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

El momento en que ocurre la expresión de alelos paternos, provee una herramienta experimental para estimar la expresión del genoma embrionario. Es así como se determinó que en ratón una variante de β_2 microglobulina (β_2 m) de origen paterno se expresa al estado de dos células.

Nuestro laboratorio ha demostrado la presencia de RNA de alto peso molecular en el núcleo de espermatozoide y ha postulado la idea que el gameto aportaría al cigoto "RNA paterno".

Se aisló RNA de espermatozoide de ratón y, por análisis de "Northern blot" con una sonda oligonucleotídica de 50 MER complementaria a parte del exón 2 del RNA mensajero de β_2 m, se demostró la presencia de una o dos especies de RNA cuyos tamaños fluctúan entre 800 y 1000 nucleótidos.

La localización del RNA de β_2 m en el núcleo del espermatozoide y en cigoto al estado de dos pronúcleos en ratón se llevó a cabo mediante hibridación *in situ* en cortes congelados de testículo y en cortes de cigoto con Digoxigenina 11-dUTP. (DID-UACH, FONDECYT 0063-90 Y STIFTUNG WOLKSWAGENWERK I-65 516).

224

LOCALIZACION DE U-RNA Y ANTIGENOS SM EN EL NUCLEO DE ESPERMATOZOIDE Y EN CIGOTO AL ESTADO DE 2 PRONUCLEOS (Localization of U-RNA and Sm antigens in the sperm nucleus and fertilized zygote with both pronuclei).

** SCHROEDER, R. BRITO, M. Y *MOLINARI, E. ** I. BIOQUIMICA, * I. EMBRIOLOGIA UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE. (PATROCINIO: I.I. CONCHA).

Nuestro laboratorio ha demostrado la presencia de RNA en el núcleo de espermatozoide. Análisis electroforético de RNA total reveló bandas con movilidades semejantes a U-RNAS extraídos de células HeLa. Análisis de "Northern blot" con sondas oligonucleotídicas marcadas con [α - ^{32}P]-dCTP en el extremo 3' reveló la presencia de aquellos U-RNAs implicados en el procesamiento de transcritos primarios (U1, U2, U4, U5, U6).

La localización inequívoca de estos U-RNAs en el núcleo de espermatozoide se llevó a cabo por histoquímica de hibridación *in situ* en frotis de espermatozoides y en cortes congelados de testículo por medio de sondas oligonucleotídicas (anti-sense y sense) marcadas con Digoxigenina 11-dUTP y en forma paralela con [α - ^{32}P]-dCTP. Consecuentemente con esto, se demostró en espermatozoide mediante análisis de "Western blot" los antígenos Sm correspondientes a las proteínas asociadas a los U-RNA que componen los sn-RNP.

La presencia de snRNP en un núcleo transcripcionalmente inactivo, como es el caso de espermatozoide, permite sugerir un rol en el procesamiento de transcritos primarios en el huevo recién fertilizado. La localización de U-RNA y antígenos Sm por las técnicas antes mencionadas en cigoto al estado de 2 pronúcleos permitirá postular la idea de un complemento paterno epigenético. (DID-UACH, FONDECYT 006390 y STIFTUNG WOLKSWAGENWERK I-65 516).

225

RNA MENSAJERO DE PRO-OPIOMELANOCORTINA (POMC) ESTA PRESENTE EN EL NUCLEO DE ESPERMATOZOIDE DE RATA. (Pro-opiomelanocortin (POMC) messenger RNA is present in rat sperm nucleus.) Yañez, A. y Concha, I.I. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile

Se ha creído tradicionalmente que la expresión del RNA mensajero de POMC ocurre sólo en pituitaria. Estudios recientes han detectado mRNA POMC, como así los péptidos originados del precusor proteico, en una serie de tejidos entre los cuales el más importante es testículo.

Nuestro laboratorio ha demostrado la presencia de RNA de alto peso molecular poliadenilado en el espermatozoide de rata. RNA total de espermatozoide se hibridó con una sonda oligonucleotídica complementaria a la región ACTH de POMC marcada radioactivamente. El mRNA POMC en espermatoziodes al igual que en testículo es de aproximadamente 800 nucleótidos, y es más corto que el reportado en pituitaria.

Estudios de hibridación *in situ* en cortes congelados de testículo con sonda oligonucleotídica marcada en el extremo 3' con digoxigenina 11 d-UTP, localizaron el mRNA POMC en el citoplasma de células de Leydig, espermatocitos y en el núcleo de espermatozoides.

La presencia de mRNA POMC en el núcleo de espermatozoides sugiere que esta información podría ser aportado al cigoto después de fertilización. Esto implicaría, además, un rol insospechado de POMC durante desarrollo temprano. (DID-UACH, FONDECYT 0063-90 y STIFTUNG VOLKSWAGENWERK I-65 516).

226

LOCALIZACION DE ALGUNAS SECUENCIAS DE INSERCION EN EL GENOMA DE Thiobacillus ferrooxidans (Localization of some insertion sequences in the genoma from T. ferrooxidans).

Cádiz, R. y Gaete, L.
Depto. Bioquímica, Fac. de Medicina, U. de Chile.

Thiobacillus ferrooxidans es una bacteria gram-negativa acidófila que utiliza ión ferroso o compuestos de azufre reducido como fuente de energía. Por estas características cumple un papel fundamental en la biolixiviación de minerales. Se ha detectado en el genoma bacteriano la presencia de una secuencia de inserción (elementos genéticos móviles que pueden participar en reordenamientos genómicos) denominada IST_2. Se ha postulado que la movilización de IS podría estar asociada con la adaptación del microorganismo con fenómenos de variación fenotípica observados en la bacteria. El objetivo de este trabajo era la identificación de las secuencias de DNA adyacentes a IST_2 y el efecto de cambios en la fuente energética sobre la posición de estos elementos en el genoma. Se postuló que mediante la reacción de PCR era posible amplificar a partir de DNA genomico los segmentos de DNA localizados entre dos IST_2. Se analizaron varias cepas de T. ferrooxidans cultivadas en medio con Fe^{+2} como fuente de energía, observandose en algunas de ellas productos de amplificación que varian entre 0,2 y 1,0 kb. Mediante la secuenciación del DNA amplificado de distintas cepas de T. ferrooxidans, se comprobó que las IST_2 detectadas se insertaban en una región del genoma de 0,9 kb. Se analizó la secuencia de los sitios blanco y de la región de las inserciones. Actualmente se encuentran en desarrollo algunos experimentos para conocer la localización de este segmento de DNA en el genoma bacteriano. Experimentos preliminares indicaron que el cultivo de T. ferrooxidans en presencia de diferentes fuentes energéticas provocó variaciones en los productos amplificados por PCR.

Financiado por FONDECYT y Universidad de Chile

227

IDENTIFICACION Y SECUENCIACION DE GENES DE RNA RIBOSOMAL DE *THIOBACILLUS FERROOXIDANS* (Identification and sequencing of rRNA genes from *T.ferrooxidans*).

Sagredo,B. y Orellana,O. Dpto. de Bioquímica,Fac. de Medicina, U.de Chile.

T.ferrooxidans es una bacteria acidófila que utiliza como fuentes de energía la oxidación de ión ferroso o de compuestos de azufre reducido. Debido a estas características fisiológicas y bioquímicas este microorganismo participa en la biolixiviación de minerales. Un estudio detallado de los fenómenos de expresión génica en esta bacteria puede constribuir a un mejoramiento del proceso industrial en que participa. En trabajos previos identificamos la presencia, en el genoma de *T.ferrooxidans*, de al menos dos operones de rRNA denominados rrnT1 y rrnT2. Estos operones presentaban sitios de reconocimiento para enzimas de restrición similares en las regiones codificantes, pero habia diferencias en las regiones espaciadoras y en los extremos de los operones. Se aisló a partir de una genoteca del genoma de *T.ferrooxidans* cepa Torma un plásmido recombinante (pTR-3) que poseia una porción de la región codificante del operón rrnT1. En este trabajo, mediante la generación de deleciones seriadas con exonucleasa III de un segmento del inserto en pTR-3 y posterior secuenciación de los DNA obtenidos por el método de terminación de las cadenas, se obtuvo la secuencia del extremo 3' del gen del rRNA 16S, la región espaciadora y el extremo 5' del gen del rRNA 23S del operón rrnT1. Se observó la presencia de dos genes para tRNA (tRNAile, tRNAala) en el espaciador.Este segmento de DNA era similar al descrito para la cepa A4, por Venegas,A. y col.(Nucleic Acids Res.(1988)16 8179.). Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR la región espaciadora del operón rrnT2. Actualmente se encuentran en desarrollo los experimentos para determinar la secuencia de este segmento del genoma bacteriano.

(Financiado por FONDECYT y Universidad de Chile)

228

AISLAMIENTO, SECUENCIACION Y EXPRESION DEL GEN QUE CODIFICA PARA RUSTICIANINA DE *Thiobacillus ferrooxidans*.(Isolation, sequencing and expression of the gene encoding for Rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*).

Moreno,F., Nunez,L. y Jedlicki,E. Dpto.de Bioquimica, Fac.de Medicina, U.de Chile.

El *T.ferrooxidans* es una bacteria quimiolitotrófica, que obtiene su energia de la oxidación de ion ferroso a ion férrico.En el transporte de los electrones liberados participa una proteina periplasmática, la Rusticianina. Experimentos previos han demostrado que cultivos de *T.ferrooxidans* crecidos en presencia de Fe^{2+} como sustrato, poseen niveles mayores de esta proteina que cuando son crecidos en un medio con azufre elemental(S^o).Con el fin de estudiar la regulación de la expresión del gen de la Rusticianina, es necesario previamente aislar dicho gen. En este trabajo se presentan las estrategias utilizadas para aislar y secuenciar este gen. A partir de DNA genómico de *T.ferrooxidans* y utilizando la tecnica de PCR,se amplificó un fragmento de 265pb correspondiente al 50% del gen que codifica para la Rusticianina, lo que fue comprobado posteriormente por la secuenciación nucleotidica de este fragmento.El segmento de DNA amplificado se utilizó como sonda para aislar el gen a partir de una genoteca de DNA de *T.ferrooxidans*.Experimentos conducentes a la obtención de la secuencia completa del gen y a estudiar su expresión en bacterias crecidas ya sea en presencia de Fe^{2+} o en S^o están en curso.(Proyectos PNUD/ONUDI,FONDECYT 0936)

229

ESTUDIOS SOBRE EFECTO DE METALES Y PEPTIDOS INHIBITORIOS EN LA CASEINA QUINASA II DE *Xenopus laevis*. (Studies about the effect of metal ions and inhibitory peptides on casein kinase II from *Xenopus laevis*).

Tellez, R. y Gatica, M. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La Caseina quinasa II (CQ II) ha sido purificada a partir de nucleos aislados de oocitos de *Xenopus laevis*. Se caracterizó en mayor detalle esta enzima con respecto a la utilización de Mg^{+2} y Mn^{+2} y de ATP y GTP como dadores de fosfato. La concentración óptima de Mg^{+2} es 7mM mientras que para Mn^{+2} es de sólo 0,75mM. Usando Mg^{+2} el Km_{app} para ATP es de 12 μM mientras que con Mn^{+2} es de 1.5 μM. El Km_{app} para GTP est de 20 μM con Mg^{+2} mientras que es de 4 μM con Mn^{+2}. Con Mg^{+2} la Vmax obtenida con ATP es superior que con GTP mientras la situación es inversa con Mn^{+2}, siendo GTP el sustrato más eficiente.
En base a estudios previos que evidenciaron la inhibición de la CQ II por copolimeros al azar de glutámico y tirosina, se ensayaron péptidos sintéticos de las siguientes secuencias definidas: YYEEEEEEEEE, EEYEEEEYEEE, EEEEEEEEEYY y DDYDDDDYDDD preparados por el Dr. S. Pongor (ICGEB). Los resultados obtenidos indican que el péptido que tiene las tirosinas en el amino terminal es significativamente mejor inhibidor que el péptido que tiene estos residuos en el carboxilo terminal. También se observó que el péptido que contiene aspártico en vez de glutámico es un inhibidor más eficiente. Estos resultados sugieren que la CQ II reconocería a estos péptidos como pseudosustratos en los que el hidroxilo de la tirosina reemplazaría al hidroxilo de la serina o treonina de los verdaderos sustratos.

Apoyado por FONDECYT y The Council for Tobacco Research.

230

CLONAMIENTO DE LAS SUBUNIDADES α Y β DE LA CASEINA QUINASA II DE *Xenopus laevis*. (Cloning of the α and β subunits of casein kinase II from *Xenopus laevis*.)

Hinrichs, M.V., Jedlicki, A.M. y Connelly, C. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La Caseína quinasa II es una proteína quinasa que fosforila residuos de treonina y serina. La holoenzima es un tetrámetro que contiene dos subunidades α o α' (o una de cada una) y dos subunidades β. El estudio de esta enzima es de alto interés pues está involucrada en los procesos de diferenciación y proliferación celular. Con el objeto de caracterizar esta enzima hemos procedido a clonar los genes que codifican para ambas subunidades. A partir de una genoteca de cDNA de ovocitos de *Xenopus laevis* y utilizando como sonda un polinucleótido sintético, análogo a una región del gen, se obtuvieron dos clones que codifican para la subunidad α. Ambos clones de cDNA son iguales en su región codificante pero diferentes en el extremo 3' no codificante. Los genes secuenciados presentan un alto grado de conservación respecto de otras especies analizadas. Con respecto a humano se encuentra un 94% de homología a nivel de aminoácidos y un 52% a nivel nucleotídico. Como nuestro interés es estudiar su actividad catalítica este gen ha sido subclonado en el vector de expresión PT7-7. Para clonar la subunidad β se diseñaron dos partidores utilizando las secuencias de otras especies ya publicadas. A partir de la misma genoteca de cDNA de *Xenopus laevis* se amplificó por PCR un fragmento de 380 pares de bases. La secuencia nucleotídica obtenida difiere de las de otras especies, sin embargo la secuencia aminoacídica es 100% homóloga al gen humano. Este fragmento se utilizará como sonda para pesquizar el gen completo usando la genoteca ya mencionada.

Apoyado por FONDECYT y The Council for Tobacco Research.

231

DESARROLLO DE SONDAS OLIGONUCLEOTIDICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE ROTAVIRUS Y VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL*. (Use of oligo nucleotidic probes for diagnostic of Rotavirus and Respiratory Syncytial Virus).

Fernández J.O.y Hernández.O., Unidad de Virología, INTA, Universidad de Chile.

Mediante la utilización de oligonucleótidos sintéticos, se desarrolló un sistema de diagnóstico no radioactivo, para la detección de Rotavirus y Virus Respiratorio Sincicial por hibridación molecular de punto. Los oligonucleotidos fueron elegidos de la región del gen que codifica el polipeptido Vp7 de Rotavirus, entre los nucleotidos 33-72 y del extremo 5'del gen que codifica para la ribonucleoproteína de VRS, entre los nucleotidos 130 y 159. Los oligonucleotidos fueron marcados con Biotina-7-dATP, incorporada a la sonda mediante el sistema de deoxinucleotidil transferasa terminal. La especificidad y sensibilidad de la hibridación para la detección de Rotavirus fue evaluada en 303 muestras que incluían 37 electroferotipos distintos de Rotavirus. La de VRS fue evaluada con 64 muestra clínicas, que incluían los subtipos A y B de mayor incidencia. Los resultados demuestran que la hibridación de punto, usando la sonda de 30 bases para la detección de VRS, reconoce específicamente los subtipos A y B, así como aislados virales de pacientes con cuadros de infección respiratoria aguda baja. El uso de la sonda de 40 bases para la detección de Rotavirus demostró que la hibridación fue más especifica y sensible que la electroforesis en geles de poliacrilamida y Elisa.

Financiado por proyecto FONDECYT 389 y SAREC.

232

TRANSCRIPCION *IN VITRO* DE VIRUS DE LA NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA (IPNV): ACTIVIDADES ENZIMATICAS ASOCIADAS A LA TRANSCRIPCION.* (*in vitro* transcription of IPNV: Enzymatic activities related to transcription). Pizarro, J.M. Unidad de Virología. INTA. Universidad de Chile.

IPNV, miembro de la familia *Birnaviridae*, es el agente causal de cuadros infecciosos altamente contagiosos y mortales en peces salmonídeos confinados en pisciculturas. Es un virus icosahédrico sin envoltura, con una cubierta proteica y que posee un genomio constituído por RNA de doble hebra bisegmentado. Se ha descrito la existencia de cuatro polipéptidos asociados a la partícula viral: VP2, el polipéptido más abundante del virión y otros tres polipéptidos denominados VP1, VP3 y VP4. El análisis de la secuencia aminoacídica indica que VP1 podría corresponder a la actividad de RNA polimerasa asociada al virión. En nuestro laboratorio se ha determinado que este polipéptido es capaz de unir nucleótidos (GTP y ATP), sugiriendo además que se trataría de una GTP binding protein. Se realizan experimentos para definir si se trata de la guanililtransferasa viral. Al realizar ensayos de transcripción *in vitro* en presencia de [32-P]-GTP y analizar los productos de la reacción mediante PAGE, se encontró marca tanto en los dos mensajeros como en el genomio viral. Previamente se ha postulado que el mecanismo de transcripción sería semiconservativo, sin embargo se realizan estudios con nucleasas para dilucidar si este tipo de marcación de productos ocurre por este mecanismo o por replicación *in vitro* del genomio.

*Financiado por Fundación Andes: Proyecto C-11001, e IFS: Proyecto A/1844-1.

233

***DESARROLLO DE UN METODO DE DIAGNOSTICO PARA LA DETECCION DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA*.** (Development of a diagnosis method for infectious necrosis pancreatic virus detection.) Sandino A.M. Unidad de Virología. INTA. Universidad de Chile.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es uno de los agentes patógenos de peces de mayor incidencia, causando una gran morbilidad y mortalidad tanto en truchas como en salmones en cultivo. Este virus pertenece a una nueva familia de virus denominada *Birnaviridae*. Los miembros de esta familia corresponden a virus sin envoltura, con estructura icosahedrica y con un genoma bisegmentado de RNA de doble hebra. Actualmente en Chile no se dispone de un método de diagnóstico específico para confirmar la presencia de este virus en peces infectados. La electroforesis en geles de poliacrilamida ha resultado ser uno de los métodos más específicos y sensibles de diagnóstico para rotavirus. Teniendo en cuenta que el IPNV, pertenece a una familia de virus con características muy semejantes a la de rotavirus, se ha diseñado como método de diagnóstico la detección del RNA genómico viral mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Este resulta ser un método rápido, de bajo costo y muy sencillo de realizar. Se estudia la especificidad y sensibilidad del método.

Financiado por Fundación Andes Proyecto C-11001 e IFS: Proyecto A/1844-1.

234

UBICACION DE 2 MUTACIONES TERMOSENSIBLES EN REPLICACION DEL BACTERIOFAGO PM2 EN EL SEGMENTO VIRAL PstI-AvaI DE 7.5 kb (Localization of the PM2 gene of replication in a viral DNA fragment PstI-AvaI of 7.5 kb). Martínez, J. y Canelo, E. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El genoma del bacteriófago PM2 está constituido de una molécula de DNA circular, sobreenrrollada de 10 kb que se replica por el modelo del círculo rotatorio. En nuestro laboratorio se han aislado 2 mutantes termosensibles defectivos en replicación del DNA viral que corresponden a un gen de replicación. Como parte de nuestro objetivo de caracterizar el mecanismo de replicación de PM2 nos interesó ubicar estas mutaciones del gen de replicación en el mapa físico viral.

La digestión doble del DNA de PM2 con las enzimas de restricción PstI y AvaI genera un fragmento de DNA de 2.5 kb y otro de 7.5 kb. Mediante técnicas de DNA recombinante hemos construido genomas virales híbridos con un segmento PstI-AvaI proveniente del fago mutante y el otro proveniente del fago silvestre en las dos combinaciones posibles. Después de transfección de la bacteria huésped, A. espejiana BAL31, se encontró que los fagos progenie presentaban el fenotipo defectivo en replicación cuando el genoma híbrido contenía el segmento de 7.5 kb proveniente de los fagos mutantes. Estos resultados localizan el gen de replicación del bacteriófago PM2 en el segmento PstI-AvaI de 7.5 kb del mapa físico viral.

Proyecto DTI B3043-9012

235

TROPISMO CELULAR DE AISLADOS DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA DEL TIPO 1 (VIH-1). (Cellular tropism of different HIV-1 isolates) Vojkovic,A., Asjo,B., Fenyo,E.M., y Espejo,R. Unidad de Virologia, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Centro de Estudios Cientificos de Santiago y Laboratorio de Virologia, Instituto Karolinska.

Se han descrito algunos aislados de VIH-1 que son capaces de crecer tanto en linfocitos periféricos (PBMC) como en lineas celulares, y otros que solo replican en PBMC. Algunos autores sugieren que este tropismo celular, observado en VIH-1, estaria dado por las etapas tempranas del ciclo replicativo, es decir, la penetración y la transcripción reversa.

Para determinar cual o cuales etapas del ciclo replicativo de VIH-1 están involucradas en el tropismo celular, se realizó un estudio comparativo de crecimiento viral tanto en PBMC como en la línea celular linfocitica Hut-78, con diferentes aislados de VIH-1. El estudio consistió en determinar, a través de la técnica de PCR, la eficiencia de entrada del virus a la célula, el aumento o disminución del número de células infectadas en el tiempo, y si estos aislados virales son o no capaces de sintetizar RNAs mensajeros.

Nuestros resultados muestran que la eficiencia de entrada de los diferentes aislados virales a las células de la linea Hut-78 y PBMC son similares. Sin embargo, en la infección con aislados que no crecen en esta linea el número de células infectadas disminuye con el tiempo hasta desaparecer.

Por último, se logró detectar la síntesis de algunos RNA mensajeros en Hut-78 infectadas con estos aislados, aunque con diferentes grados de eficiencia entre un aislado y otro.

Estos resultados indican que, en los aislados estudiados, el tropismo celular de VIH-1 no está determinado por la entrada del virus a la célula, y que el o los factores involucrados pueden variar de un aislado viral a otro. (Proy. SAREC y FONDECYT 91-1099)

236

REPARACION DEL DNA DE UN PLASMIDO QUE CONTIENE FOTOADICIONES DE 8-METOXIPSORALENO EN *S.cerevisiae*. (Repair of plasmid DNA containing 8-methoxypsoralen photoadditions in *S.cerevisiae*).

Magaña-Schwencke, N., Institut Curie-Biologie, 26, rue d'Ulm 75231 Paris, France.

Los psoralenos en presencia de radiacion ultravioleta cercana (365 nm, UVA) fotoreaccionan con el DNA formando lesiones (monoadiciones, puentes intercatenarios). La reparacion de estas lesiones origina mutaciones y recombinacion. Los mecanismos moleculares implicados en estos procesos no estan bien definidos en los organismos eucariontes. En nuestro laboratorio empleamos la levadura como sistema eucarionte modelo por sus ventajas para el trabajo genetico y bioquimico. En *S. cerevisiae*, los tres sistemas fundamentales de reparacion del DNA intervienen en la reparacion de las fotoadiciones producidas por 8-metoxipsoraleno(8-MOP) sobre el DNA genomico.

Con objeto de conocer mejor estos procesos, he transformado cepas de *S.cerevisiae* (silvestre y mutantes en una de las vias de reparacion) con un plasmido que contiene fotoadiciones de 8-MOP) y he medido luego la sobrevivencia del plasmido que refleja la capacidad de reparacion de cada cepa.

Los resultados obtenidos indican que las monoadiciones y puentes intercatenarios son reparados por excision-resintesis con la misma eficacia para DNA endogeno o exogeno. En cambio, el sistema de reparacion mutagenico asi como el de recombinacion presentan diferencias de actividad para la reparacion de fotoadiciones segun ellas se encuentren sobre el DNA genomico o plasmidico. Estas diferencias pueden estar relacionadas a la diferente complejidad de la molecula de DNA plasmidico c/r al genomico.

237

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI OMPC DE *SALMONELLA TYPHI* COMO HERRAMIENTA PARA DETECTAR REGIONES DE LA PROTEINA EXPUESTAS EN LA SUPERFICIE BACTERIANA. (Monoclonal antibodies anti *Salmonella typhi* OmpC as a tool to detect exposed regions of the protein at the bacterial surface).

Hinrichsen, J.P. Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: A. Venegas).

Una herramienta analítica útil para el estudio de determinantes expuestos de proteínas de membrana externa de cepas bacterianas Gram (-) es el uso de anticuerpos monoclonales. De estos estudios es posible desarrollar ensayos de identificación de cepas bacterianas.

Se evaluó un panel de 26 monoclonales anti-porina OmpC de *S. typhi*, producidos en BIOS Chile. El antígeno utilizado en la producción de estos monoclonales se purificó del clon recombinante *Escherichia coli* pSTP2B1/UH302, que solo expresa OmpC de *Salmonella typhi*.

Se estudió la reactividad de los monoclonales frente a proteínas de membrana externa de *S.typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella paratyphi* A y B y *E. coli* por ELISA, PAGE-SDS y el correspondiente Western blot, y frente a bacterias enteras por ELISA. Del análisis del panel, una parte importante de los monoclonales dio reacción con LPS de *E. coli* , el cual, normalmente contamina la porina usada como antígeno. Se encontraron tres monoclonales (6A5, 6C12 y 9B5) que reaccionaron con trímeros de porina OmpC de *S. typhi*, y también con bacterias *S. typhi* enteras. Estos monoclonales no reaccionaron con porinas de *E. coli*, pero sí lo hicieron con proteínas de membrana externa de otras *Salmonellas*. Para definir si las proteínas de *Salmonella paratyphi* A y B que reaccionaron con los monoclonales corresponden a porinas, éstas se ensayaron por ELISA luego de purificadas por los métodos usados para obtener trímeros de porinas. Las bandas obtenidas en geles PAGE-SDS con estas proteínas fueron similares a las observadas para trímeros de porina de *S. typhi* y *S. typhimurium*. Además, al calentar las muestras a 100 C se observaron bandas de peso molecular correspondiente a monómeros. A modo de comprobación, se procedió a estudiar la regulación de estas proteínas variando la osmolaridad del medio. Al crecer *S. paratyphi* A y B en medios de baja osmolaridad apareció una tercera banda en Western blot, como se ha descrito para *S. typhimurium*.

Se concluye que la proteínas de membrana externa de *S. paratyphi* A y B que reaccionan con estos 3 monoclonales, corresponden a porinas con determinantes expuestos comunes a aquellos de OmpC de *S. typhi*, pero que difieren de los de *E. coli*.

Financiado por proyectos FONDECYT 682/91 y AID 513-5542-G-SS-9068-00.

238

CLONAMIENTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO DE TRUCHA ARCOIRIS POR PCR Y SU EXPRESION EN *ESCHERICHIA COLI*. (Cloning of rainbow trout growth hormone by PCR and its expression in *Escherichia coli*).

Müller, I., Ocaranza, M.P., Hevia, E. Laboratorio de Biología Molecular. Bios-Chile I.G.S.A. (Patrocinio: A. Yudelevich).

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

Con este objetivo, a partir del cDNA de la hormona de trucha arcoiris (tGH), se amplificó la región correspondiente a la zona codogénica via PCR, mediante el uso de 2 oligonucleótidos derivados de la secuencia de los extremos del cDNA. El fragmento amplificado se ligó al vector de expresión pKK233-2 y se estudió la expresión por Western Blot en distintas cepas de *Escherichia coli*.

Con el fin de cuantificar el nivel de hormona, se produjeron hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales anti-tGH, 58 de los cuales han sido caracterizados por su capacidad de reconocer la hormona de trucha aislada de pituitaria y la hormona recombinante producida en bacteria. Mediante un test ELISA se detectó que la hormona producida en *E. coli* correspondió a un 0.18% de la proteína total. Los niveles máximos de expresión se obtuvieron en fase logarítmica temprana del crecimiento de la cepa JM109. Además, los anticuerpos monoclonales obtenidos están siendo utilizados para la purificación de la hormona por cromatografía de inmunoafinidad.

Estudios de compartamentalización mostraron que la hormona se encuentra formando parte de cuerpos de inclusión en la bacteria.

Estos resultados indican la factibilidad de producir la hormona de trucha en bacterias y utilizarla masivamente en piscicultura.

Financiado por proyecto FONDECYT 619/90.

239

DNA MITOCONDRIAL: NIVELES DE DIFERENCIACION Y RELACIONES FILOGENETICAS ENTRE SUBESPECIES DE POCKET GOPHERS, Thomomys talpoides. (Mitochondrial DNA: levels of differentiation and phylogenetic relationships among pocket gophers subspecies, Thomomys talpoides).

Apfelbaum, L.I., Orrego, C. y Patton, J.L. Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley, USA. (Patrocinio: A. Spotorno).

Por medio de la reaccion en cadena de la polimerasa (PCR), se estudio la variacion genetica en un fragmento de 567 pb del gen mitocondrial citocromo b en 3 especies y 12 subespecies del complejo T. talpoides y una subespecie del grupo T. bottae. La comparacion de a pares de las secuencias revelo la existencia de un amplio rango de valores entre las subespecies (1.8-14.8%). Algunos de estos valores se aproximan al nivel de diferenciacion observados entre especies. El cladograma mas parsimonioso, basado en 128 sitios filogeneticamente informativos, indico que el complejo talpoides es monofiletico en relacion al grupo bottae, en coincidencia con otros criterios. Sin embargo, T. talpoides y T.mazama aparecen como grupos parafileticos, lo cual esta en desacuerdo con la definicion sistematica. Las relaciones filogeneticas que resultaron usando "peso" en los caracteres que producen transversiones, fue diferente a la obtenida cuando los sitios no fueron "pesados". Estos resultados indican que la desviacion observada en las transiciones influencian la filogenia, sin embargo las relaciones filogeneticas estan en desacuerdo con las evidencias organismicas. La informacion de secuencias obtenida a partir de pieles secas de coleccion plantea la posibilidad de una relacion filogenetica mas coherente con otros criterios. La tasa de divergencia del gen del citocromo b (calibrada con las secuencias publicadas para este gen en Mus y Rattus y datos fosiles del ancestro comun), sugiere que el genero Thomomys es mas antiguo de lo que indican los registros fosiles.

240

DNA DE Citrus limonum. LOCALIZACION DEL GEN DE PAL.(C. limonum DNA. Localization of the PAL gene). Opitz, X., Seelenfreund, D., Pérez, L. M. (Dep. Bioq. Biol. Mol., Fac. Cs. Quím. Farm., U. de Chile).

Plántulas de C. limonum responden a la infección por fitopatógenos, induciendo a la fenilalanina amonio liasa (PAL). Sin embargo, se desconoce cuál es la ubicación de su(s) gen(es) dentro del genoma de esta planta.

Antecedentes experimentales obtenidos en el laboratorio sugieren la participación de elementos extra nucleares en la inducción de la PAL. Por lo tanto, es importante determinar la localización subcelular del gen(es) de PAL para comprender el mecanismo de defensa del tejido.

Se aislaron cloroplastos y mitocondrias de C. limonum mediante centrifugación diferencial, partición de fases y/o gradiente de Percoll. A partir de estas preparaciones organelares y homogeneizados totales de plántulas, se extrajo DNA usando el método del CTAB, posterior extracción con cloroformo y precipitación con isopropanol.

Los DNA obtenidos fueron caracterizados mediante el uso de enzimas de restricción, y su pureza se determinó hibridando con sondas específicas (dot-blot). Posteriormente, cada DNA fué hibridado con un cDNA aislado de poroto (pPAL 5).

Los resultados de las hibridaciones sugieren la presencia del gen ó genes de PAL en más de un compartimento subcelular.

Financiado por FONDECYT 91-0886 y 90-0066, y DTI 2950 (U. Chile). Se agradece la colaboración de M. Chiong y de J. Fernández.

241

ESTRUCTURA Y SECUENCIACIACION DEL GEN GENOMICO HUMANO PARA CASEINA QUINASA II. (Structure and sequence of human genomic casein kinase II gene) Devilat,I Carvallo,P Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La importancia de la caseina quinasa II (CKII) radica en estudios realizados en los últimos años, y que sugieren su participación en la división celular. Esta proteina quinasa fosforila enzimas relacionadas con la duplicación del DNA, la transcripción y algunos oncogenes. El conocer la estructura y secuencia de los genes genomicos para las subunidades α, α' y β, con sus respectivos promotores, es de gran importancia para estudiar la regulación de este gen. En este trabajo se presenta la amplificación del gen genómico para la subunidad α de CKII, por la técnica de PCR. Para esto se diseñaron partidores específicos para este gen, a partir de la secuencia del cDNA publicada en la literatura. Los fragmentos amplificados revelaron un tamaño exacto al esperado para el cDNA, y su secuencia resulta identica a aquella publicada en la literatura. Estos resultados indicarían que el gen humano para la subunidad α de CKII, no posee introns. No hemos encontrado codones de término dentro de la secuencia, y los codones de inicio y término originales estan presentes en la misma posición del cDNA. Esto indicaría que no estamos en presencia de un seudogen. Además se han encontrado polimorfimos en la secuencia de este gen, en DNA proveniente de diferentes individuos.(FONDECYT 90-1186).

242

ESTRUCTURA GENOMICA DE LA SUBUNIDAD α DE CASEINA QUINASA II DE Xenopus laevis. (Genomic structure of the α subunit of Xenopus laevis casein kinase II). Wilhelm,V. y Allende,J.E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La caseina quinasa II es una proteina quinasa constituida por 2 ó 3 subunidades en la forma $\alpha 2 \beta 2$ o $\alpha\alpha' \beta 2$. La actividad de esta enzima se ha visto incrementada en células en activa proliferación. Este antecedentes y el hecho de que diversas oncoproteinas nucleares son fosforiladas por esta enzima han sugerido que CKII estaría involucrada en la regulación de la proliferación celular.En nuestro laboratorio se han aislado y secuenciado dos clones de cDNA para la subunidad α de CKII de X.laevis. En base a esta secuencia, se diseñaron varios oligonucleotidos, los que fueron usados como parejas de partidores en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos fueron amplificados usando como templado DNA de hígado de X.laevis. Los resultados obtenidos han demostrado que este gen contiene un minimo de 6 introns. Con algunas parejas de partidores se han amplificado dos fragmentos de diferente tamaño. La secuencia de dos de estos fragmentos indica que la variación en tamaño se debe a una diferencia en el largo de cada uno de los introns. Además uno de estos fragmentos posee una region codificante exactamente igual al cDNA previamente clonado, y el otro presenta algunas variaciones en esta region. Se demuestra así la existencia de dos genes que codifican para la subunidad α de CKII de X.laevis. (FONDECYT 91-1309 y Council for Tobacco Research).

243

ANALISIS DE MUTACIONES O DELECIONES EN EL GEN DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN PACIENTES CHILENOS. (Analysis of mutations or deletions in the growth hormone gene in chilean patients) Aguirre,E.y Benitez,R. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: Pilar Carvallo)

La deficiencia de hormona de crecimiento es bastante frecuente en Chile. Una de las causas de deficiencia de hormona de crecimiento es la de tipo 1A, en cuyos pacientes se ha encontrado una deleción del gen. Entre los pacientes chilenos analizados, hemos encontrados tanto en casos aislados como en dos niños provenientes de una familia, la deleción del gen para hGH. Estos resultados se obtuvieron analizando el DNA genómico de estos pacientes por la técnica de Southern, y utilizando como sonda el cDNA humano para la hormona. En otros pacientes analizados se detectó la presencia del gen, a pesar de que los análisis clínicos revelaron ausencia de la hormona. Esta deficiencia podría corresponder a la de tipo 2, cuya mutación no ha sido descrita aún. Los análisis de RFLP realizados no descartan la posibilidad de que la mutación estuviera dentro del gen. Por esta razón hemos diseñados partidores específicos para amplificar el gen de hGH en estos pacientes y luego realizar la secuenciación de los fragmentos de DNA obtenidos, con el fin de pezquizar una posible mutación.El diagnóstico genético molecular en los niños afectados por una deficiencia de hGH se hace imprescindible para un tratamiento adecuado de ellos. (Proyecto FONDECYT 90-1186 dirigido por Pilar Carvallo)

244

CARACTERIZACION DEL GEN *bstVIR* de Bacillus *stearothermophilus* V. (Characterization of the Bacillus stearothermophilus V *bstVIR* gene). Claudio Vásquez y Carlos Lobos. Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Recursos Naturales, Universidad de Talca. (Patrocinio: Aldo Solari).

El bacilo termofílico facultativo Bacillus stearothermophilus V especifica el sistema de modificación-restricción BstVI. Las enzimas componentes reconocen y actúan sobre la secuencia 5'-CTCGAG-3' y son por lo tanto isosquizómeros del sistema XhoI. Los genes responsables de la síntesis de las enzimas R•BstVI y M•BstVI han sido clonados en E. coli, donde se expresan eficientemente. Experimentos de subclonamiento nos han permitido disectar el operón y obtener clones bacterianos que llevan ambos genes en forma independiente. Nos hemos abocado a caracterizar primeramente el clon que lleva el gen *bstVIR*, debido al interés que despierta el descifrar los mecanismos moleculares que hacen posible la viabilidad de clones cuyo fenotipo es m^-r^+. La secuencia nucleotídica del gen ha sido determinada y su producto, es decir, la endonucleasa BstVI, ha sido purificada a homogeneidad. Se ha preparado anticuerpos anti-BstVI en conejo, los que reconocen específicamente a su antígeno. Hemos detectado además actividad endonucleásica en los sobrenadantes de los cultivos de bacterias que llevan este gen. Este hecho no es compatible con una lisis celular. Además, cuando el gen es expresado en huéspedes permisivos al fago lambda, la cepa no es capaz de restringir al fago, sugiriendo que la enzima no sería funcional in vivo.

Financiado pos Fondecyt 003/89.

245

EXPRESION DE LOS GENES DEL SISTEMA DE MODIFICACION-RESTRICCION DE *Bacillus stearothermophilus* V DURANTE LA ESPORULACION.(Genic expression of modification-restriction system from *B. stearothermophilus* V during sporulation). González, E., Saavedra, C. y Padilla, C.A. Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Recursos Naturales, Universidad de Talca. (Patrocinio: E. Hubert.)

Durante la esporulación de bacterias del género *Bacillus* ocurre una serie de cambios morfológicos, asociados a la expresión diferencial de una gran variedad de genes. Hemos analizado este proceso de expresión génica en *B. stearothermophilus* V, empleando como modelo de estudio los genes del sistema de modificación-restricción de esta bacteria. Para ello se ha establecido las condiciones de cultivo, a fin de obtener células tanto en crecimiento vegetativo, como en diferentes etapas del ciclo esporulativo. Se ha medido las actividades enzimáticas correspondientes a la endonucleasa (R•BstVI) y metilasa (M•BstVI), circunscribiéndose su detección al estado vegetativo y la primera etapa de esporulación. Los mecanismos moleculares responsables de este fenómeno han sido analizados mediante hibridación de ácidos nucleicos (Southern y Northern), como asimismo mediante transcripción *in vitro* en un sistema constituido por los genes en estudio, que han sido previamente clonados y la RNA polimerasa homóloga aislada de bacterias en diferentes estados de esporulación. Los resultados de tal análisis son presentados en este trabajo.

Financiado por Fondecyt 91-0127.

246

EFECTO INHIBITORIO DE LA REGION DEL PEPTIDO SEÑAL DEL GEN DE *ompC* DE *S.typhi* SOBRE LA EXPRESION DE *OmpC* ENDOGENA DE *E. coli*. (Inhibitory effect of signal peptide region from *S. typhi ompC* gene on the expression of endogenous *E. coli OmpC*). Rigotti, A., Gómez, M.I., Martínez, M.T., Venegas, A. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La expresión de *ompC* de *S. typhi* en *E. coli* determina inhibición en la síntesis de las porinas endógenas del hospedero (*ompC*, *ompF*). El efecto inhibitorio sobre *ompF* es a nivel post-transcripcional, pero el mecanismo represor sobre *ompC* de *E. coli* no ha sido definido, postulándose un efecto a nivel transcripcional (secuestramiento de *ompR* por promotor exógeno) o traduccional. Se propone precisar el rol de la zona promotora y del péptido señal del gen de *ompC* de *S. typhi* en la inhibición de la expresión de *ompC* de *E. coli*.

Se construyeron diferentes genes deletantes de *ompC* de *S. typhi*: pSTP2SX que contiene sólo la zona codificante de *ompC*, sin la región promotora ni el extremo 5' del péptido señal y pSTPΔPS y pSTP2DΔPS con deleciones selectivas de todo el péptido señal o de su región central respectivamente, con integridad del resto del gen. La expresión de porinas se analizó mediante SDS-PAGE y Western blot.

En comparación a los controles, con efecto inhibitorio sobre *ompC* de *E. coli*, todas las construcciones con deleciones parciales o total del péptido señal de *ompC* de *S. typhi*, si bien expresaban la porina transformante, no demostraron efecto represor sobre la porina hospedera. Además, la inhibición no se correlacionó con la conservación de la zona promotora del gen de *ompC* transformante.

En conclusión, el fenómeno inhibitorio de *ompC* de *S. typhi* sobre *ompC* de *E. coli* no está determinado por la zona promotora del gen, sino que sería dependiente de la integridad de la región del péptido señal del gen transformante, sugiriendo la existencia de inhibición a nivel co- o post-traduccional.

Financiado por FONDECYT 682-91 y AID 513-5542-G-SS-9068-00.
A. Rigotti es becario de Fundación Andes.

247

CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LA MUTANTE TERMOSENSIBLE EN LA PROTEINA VP3 DE ROTAVIRUS DE SIMIO SA-11.(Phenotypic characterization of the simian rotavirus temperature-sensitive mutant in the VP3 protein).Vásquez, M., Spencer,E. Unidad de Virología. INTA. Universidad de Chile.

La partícula de rotavirus está formada por dos cubiertas polipeptídicas y un core central donde se ubica el genoma constituido por once segmentos de RNA doble hebra. La cubierta externa la constituyen los polipéptidos VP7 y VP4. La cubierta interna esta formada exclusivamente por el polipéptido VP6 y el core por los polipéptidos VP1, VP2 y VP3. Las partículas sin cubierta externa realizan la transcripción tanto *in vitro* como *in vivo*. Los mismos polipéptidos son los responsables de la replicación del genomio *in vivo*. Sin embargo la función de cada polipéptido en ambos procesos es desconocida así como su relación estructural en la diferentes partículas virales. Se ha determinado que VP3 es la guanililtransfera viral utilizando partículas purificadas,pero su rol durante la morfogénesis viral es desconocido. Como una forma de determinar la función de VP3 se utiliza una mutante termosensible (TsB), que posee una mutación en el segmento que codifica para VP3. La caracterización de transcripción *in vitro* indica que la mutante no tiene la actividad guanilitransferasa alterada. Sin embargo, los resultados obtenidos al estudiar la morfogénesis demuestran que a la temperatura restrictiva está tiene alterada tanto la transcripción, replicación y la formación de la progenie, lo que sugiere que VP3 cumple otra función en la partícula fuera de guanililtransferasa.

* Financiado FONDECYT 1017 y Proyecto SAREC.

248

Caracterización Bioquímica de las Proteínasas de Carica Candamarcensis L
A Biochemical Characterization of Proteinases From Carica Candamarcensis L

C.E. Salas, L.M. Bravo, M. Gravina & H. Dewes.-
Centro de Biotecnología U.F.R.G., & Laboratorio Biotecnología Fundacao Hemocentro de Sao Paulo / U.S.P. Sao Paulo.

Papaína, es el nombre con que se designa un conjunto de proteínasas presentes en el latex del fruto **Carica Papaya L.** La papaína posee múltiples aplicaciones industriales, gracias a su amplio espectro de acción proteolítica y a la relativa facilidad con que es obtenida.

Carica Candamarcensis L., es otra planta del mismo género que también produce latex, sin embargo, su actividad proteolítica es de 5 a 10 veces mayor que la del latex de **Carica Papaya L.**, (Baeza, Correa & Salas, 1990).

Para determinar las causas que dan cuenta de las diferencias en actividad proteolítica entre estos dos tipos de latex, hemos caracterizado bioquimicamente los componentes del latex **Carica Candamarcensis L.**-

Los resultados obtenidos mediante experimentos por **PAGE-SDS, PAGE** en geles ácidos, isoelectrofocalización, Western blot y estudios de actividad **In Situ**, después de **PAGE** revelan que entre un 50% a 70% de los componentes del latex **C. Candamarcensis L**, son diferentes a los detectados en **C. Papaya L.**

Secuenciamiento del extremo NH2 terminal de una de las proteínas aisladas confirma la presencia exclusiva de esta enzima en **Carica Candamarcensis L.**-

249

Búsqueda e identificación de cepas locales de *Bacillus thuringiensis*
(Search and identification of local strains of *Bacillus thuringiensis*) E. Huberi, P. Espinoza, C. Theodulos, J. Sáez, G. Vizcarra, C. Padilla, C. Parra, L. Meza-Basso. Programa de Biología Vegetal, Facultad de Recursos Naturales, Universidad de Talca.

La productividad de las especies de cultivo es afectada por el ataque de insectos que provocan pérdidas severas en el rendimiento. Uno de los enfoques para resolver este problema es la utilización de micro-organismos con propiedades entomopatogénas. El de mayor éxito ha sido la bacteria *Bacillus thuringiensis*, cuya actividad insecticida radica en una proteína de 140 kDa sintetizada durante la esporulación como protoxina. Esta molécula se solubiliza al pH alcalino del intestino medio de los insectos susceptibles, causándoles una parálisis inmediata del intestino y el cese de la ingesta.

Se han aislado cepas locales de *B.t.*, caracterizadas en cuanto a su perfil electroforético, morfología del cristal parasporal por microscopía electrónica, reacción inmunológica y ensayos de toxicidad contra larvas de *Heliothis zea*.

Se purificaron los DNAS *in situ* y se examinó la distribución de los plasmidios de alto y bajo PM. Se seleccionaron 3 cepas locales de acuerdo a este criterio. La localización de los genes se realizó mediante hibridación southern empleando una sonda sulfonada de 726 pb proveniente de una región conservada de la sub-especie *berliner*. En un caso, el gen de la toxina sería de origen cromosomal. Las cepas en estudio fueron digeridas con Hind III mostrando un perfil de digestión diferente entre sí y distinto al conseguido con la cepa comercial *var. kurstaki*. Los fragmentos Hind III fueron transferidos a papel de nitrocelulosa e hibridados con la misma sonda.

Se trabaja en la tipificación serológica de estas nuevas cepas, en el clonamiento molecular de cada uno de estos genes y su expresión en *E. coli*.

Financiado: Fondecyt 91/0128 y PNUD/UNESCO RLA 83/003/009 y DIUT/310.

250

CARACTERIZACION DE UN PLASMIDIO QUE CODIFICA LA SINTESIS DE BETA-LACTAMASA EN Shigella flexneri. (Characterization of a plasmid codifying for B-Lactamase in S. flexneri). Echeverría, V., Mondaca, M.A., Cid, H. Departamento de Microbiología, y Departamento de Biología Molecular, Fac. Cs. Biol. y Rec. Nat. Universidad de Concepción

Shigella flexneri es una bacteria de la familia enterobacteriaceae que frecuentemente presenta multiresistencia de origen plasmidial. La resistencia a ampicilina está dada por la síntesis de B-Lactamasa una enzima que hidroliza el anillo B-Lactámico de este antibiótico. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de un plasmidio de una cepa de S. flexneri UCC129 que codifica la síntesis de B-Lactamasa.
Se estudió el nivel de resistencia de S. flexneri a Ampicilina (Amp) determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por la técnica de dilución seriada en tubo. Se aisló el plasmidio por la técnica de extracción alcalina de Kado y Liu modificada por Rockelle y se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. Se estudió la transferencia de la resistencia a Amp, por conjugación interrumpida en medio líquido, utilizando como cepa receptora a E. coli K-12 (AN^R). Se determinó el mapa de restricción del plasmidio transferido, responsable de la resistencia a Amp. La CMI para Amp fue de 4096 ug/ml. Las transconjugantes aisladas presentan una CMI entre 2048 y 4096 ug/ml y presentaron la misma banda de ADN extracromosomal que la cepa dadora. El peso Molecular aproximado del plasmidio fué de 100 Kb. Se informan los sitios de restricción para EcoRI, EcoR5, BamHI, Sau 3A, HindIII. Las transconjugantes fueron obtenidas a tiempos cortos, 3 min y 5 min, lo cual permite concluir que la resistencia a Amp está mediada por un plasmidio de 100Kb altamente transferible, hecho muy positivo para obtención de cepas sobre o hiperproductoras.

D.I. Univ. de Concepción Proyecto 20.31.34
Convenio GTZ DAAD-FONDECYT.

251

CARIOTIPO Y LOCALIZACION DE GENES EN POBLACIONES DE TRYPANOSOMA CRUZI MEDIANTE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO. (Kariotype and chromosomal gene location on T. cruzi populations by pulse field gel electrophoresis). Solari, A., Henrikson, J. y Petterson, U. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Biomedical Center, Univ. of Upsala.

El parásito Trypanosoma cruzi agente causal de la enfermedad de Chagas presenta una gran heterogeneidad de acuerdo a estudios previos de caracterización de la especie mediante: análisis isoenzimático, reactividad con lectinas o anticuerpos monoclonales y mediante RFLP del DNA kinetoplastídico. Como una manera de dilucidar la heterogeneidad dentro de la especie, hemos iniciado el estudio del cariotipo, asi como la localización de algunos genes del parásito mediante electroforésis de campo pulsado.
Se analizaron 12 poblaciones de T. cruzi de Chile y 6 de Colombia. A su vez se utilizaron como control 2 poblaciones de T. rangeli, S. serevisae y S. pombe. Del análisis de cariotipos mediante tinción con Bromuro de Etidio se desprende que cada población posee un número característico de cromosomas entre 15-20 y tamaño entre 450-2.200 k bases. El uso de 2 sondas de DNA pertenecientes a los genes SAPA y Cruzipaína y análisis de Southern, permitió clasificar a las poblaciones de T. cruzi en varios subgrupos.
Mientras las poblaciones chilenas se pudieron diferenciar en tres grandes grupos, las colombianas resultaron todas diferentes entre si. Las poblaciones de T. rangeli no dieron señales positivas de hibridación reflejando la gran utilidad de estas sondas para distinguir entre tripanosomatideos cercanos como son T. cruzi y T. rangeli.
Proyecto financiado por CONICYT-SAREC.

252

MECANISMO CINETICO DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE LEVADURA. (The kinetic mechanism of yeast phosphoenolpyruvate carboxykinase) Jabalquinto A.M. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile. (Patrocinio: G.Zuñiga)

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de levadura cataliza la reacción :
oxaloacetato (OAA) + ATP --- ADP + CO_2 + PEP
La velocidad de la reacción se determinó espectrofotométricamente mediante un ensayo acoplado. El análisis de los resultados se efectuó usando el programa EZ-FIT.
Los experimentos de inhibición por bicarbonato mostraron inhibición competitiva, al variar tanto OAA como ATP. El PEP fue un inhibidor competitivo con respecto al ATP y no competitivo respecto al OAA. Por otra parte, el ADP mostró una inhibición competitiva al variar OAA y no competitiva al variar ATP.
Un análogo de punto muerto del ATP (etenoATP) exhibió inhibición competitiva vs ATP y no competitiva vs OAA. En tanto que, el Bsulfopiruvato (análogo de punto muerto del OAA) mostró una inhibición competitiva con respecto al OAA y no competitiva al variar el ATP.
Estos resultados sugieren que el mecanismo cinético de esta enzima es Bi-Ter al azar con la formación de dos complejos abortivos (E-OAA-PEP y E-ATP-ADP).

Financiado por Dicyt-USACH y Fondecyt.

253

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DEL DERIVADO FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA-FENILGLIOXAL. (Stability studies of the fructose-1,6-bisphosphatase-phenylglyoxal derivative). Cárcamo, J.G., Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia. (Patrocinio: J.C. Slebe).

Estudios de modificación química de residuos de arginina en fructosa-1,6-bisfosfatasa renal de cerdo, de nuestro laboratorio, han mostrado que es posible obtener un derivado con una menor sensibilidad al inhibidor alostérico AMP, sin afectar mayormente otras propiedades de la enzima (Cárcamo, et al., Arch. Biol. Med. Exp., 23, R 371, 1990). Para la identificación de los residuos modificados es necesario tener un derivado estable. La estabilidad depende de la enzima, de la formación de mono o diaducto y del tampón utilizado (Vanderbunder et al., Biochemistry. 20, 2354-2360, 1981).

Estudios comparativos del derivado fructosa-1,6-bisfosfatasa-fenilglioxal obtenidos al utilizar borato o fosfato de sodio como tampón de modificación, muestran que existen diferencias en la estabilidad a distintos pH, en la cinética de incorporación de ^{14}C-fenilglioxal a la enzima y en el número de moléculas de fenilglioxal unidas por residuo de arginina. En amortiguador borato se obtiene un aducto mono fenilglioxal-arginina que es estable a pH ácido (bajo 4) solamente, mientras que en tampón fosfato se forma un aducto difenilglioxal-arginina, relativamente estable a pH neutro e igualmente estable en condiciones ácidas; a diferencia del mono derivado el diaducto absorbe a 250 nm.

Los resultados sugieren que dos residuos arginina estarían comprometidos con la inhibición alostérica de la enzima por AMP. Las condiciones de modificación descritas permitirán la identificación de estos residuos en la estructura primaria de la proteina.
(Financiado por: DID UACH, S-89-37; FONDECYT, 188/89.)

254

IDENTIFICACION DE LOS RESIDUOS LISINA INVOLUCRADOS EN LA INHIBICION DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA POR AMP. (Identification of the lysine residues involved in the AMP-inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase). Ludwig, H. y Slebe, J.C., Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

La fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo es una proteina tetramérica que presenta un residuo de lisina por subunidad cuya carbamilación conduce a la pérdida del efecto cooperativo de la inhibición por AMP y un segundo residuo de lisina involucrado en la unión del nucleótido (Slebe et al., J. Prot. Chem. 2, 437, 1983).

Con el objetivo de identificar estos residuos lisina se trató la enzima con cianato radiactivo, en dos diferentes condiciones de reacción, obteniéndose un derivado que presentaba carbamilación selectiva de los residuos de lisina involucrados en la cooperatividad (FBPasa-1), y un segundo derivado en el cual se habían modificado ambos tipos de residuo (FBPasa-2). FBPasa-1 incorporó 1,5 moles de carbamoilo-^{14}C por mol de subunidad, mientras que para FBPasa-2 este parámetro fué de 4,5. Ambos derivados fueron carboximetilados y sometidos a hidrólisis tríptica. Los péptidos fueron separados por cromatografía de fase reversa en HPLC. Se obtuvieron las composiciones aminoacídicas así como las secuencias aminoterminales de los péptidos radiactivos mayoritarios, lo que permitió asignarlos a fragmentos de la secuencia aminoacídica de FBPasa. El análisis de los resultados indica que Lys-50 y Lys-112 son los residuos involucrados en el efecto cooperativo de la inhibición por AMP y en la afinidad por el nucleótido, respectivamente.

(Financiado por: DID-UACH, S-89-37, FONDECYT, 188/89).

255

APIRASA EN PLACENTA HUMANA. (Apyrase in human placenta). Quintar, R., Valenzuela, M.A., Collados, L. Depto. Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

La placenta humana requiere de la mantención de un flujo sanguíneo adecuado de sangre materna. Este flujo estaría facilitado por la presencia de una actividad ADPásica, inhibidora de la agregación plaquetaria, permitiendo la apropiada fluidez sanguínea.
El objetivo de nuestro trabajo fue ver si esta actividad podría corresponder a la apirasa cuya característica es hidrolizar ATP y ADP en presencia de Ca^{2+}. Para realizar esto, primero, se localizó subcelularmente las actividades ATPásica-ADPásica en la porción microsomal y luego se caracterizó dicha fracción.
La caracterización cinética mostró que tiene una gran inespecificidad frente a nucleosidos di- y trifosfatos. Los cationes Ca^{2+}, Mg^{2+} y Mn^{2+} activaban la reacción. Se demuestra también que las actividades ATPásica y ADPásica corresponden a una verdadera apirasa mediante el efecto de diversos inhibidores.
Además de estas propiedades cinéticas, propias de la apirasa, se comprobó que estas actividades pertenecen a una misma proteína por su coelución de una columna de Sepharose 6B y por corresponder a una misma banda de proteína eluídas de un isoelectroenfoque.
Finalmente, se puede concluir la existencia de apirasa en placenta humana porque anticuerpos contra la enzima vegetal interactúan con esta fracción microsomal.

FINANCIADO POR PROYECTO FONDECYT 90-1006.

256

MODIFICACION DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE HIGADO DE RATA CON DERIVADOS DEL PIRENO. (Labeling of rat liver phosphoenolpyruvate carboxykinase with pyrene thiol reagents).

Rojas, M.C., Encinas, M.V. y Cardemil, E. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, U. de Chile y U. de Santiago de Chile. (Patrocinante: L.Chayet).

Las carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas (PEPCKs), catalizan la descarboxilación de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato y pueden ser dependientes de ATP o GTP según su origen. La enzima de hígado de rata utiliza GTP y puesto que tiene residuos de cisteína muy reactivos en o cerca del sitio del nucleótido, se investigaron las propiedades de esta región mediante modificación con pirenomaleimida y pirenoyodoacetamida. Ambos reactivos en cantidades estequiométricas con la enzima, la inactivan completamente y paralelamente se modifica un residuo de aminoácido que se identificó como la Cys 288. El GDP-Mn protege completamente de la inactivación.

El decaimiento fluorescente del pirenomaleimida en la enzima, es biexponencial. Esta heterogeneidad da cuenta de distintos microentornos sensados por la sonda, los que podrían deberse a la contribución de dos conformaciones de la enzima.

En presencia de un exceso de pirenoyodoacetamida, se incorporan dos moles de pireno por mol de enzima junto con la aparición de una banda de emisión ancha, centrada a 470 nm, propia de un dímero del pireno en el estado excitado (excímero). La secuenciación de los péptidos que contienen los sulfhidrilos modificados, permitió identificar una segunda cisteína reactiva.

Financiado por FONDECYT 90-004, 91-0046 y DTI Universidad de Chile Q 3068-9013.

257

PURIFICACION DE UNA ENZIMA B-GLUCOSIDASA ALTAMENTE ASOCIADA A UNA PROTEASA DE Cucurbita ficifolia. (Purification of a protease-associated B-glucosidase from C. ficifolia).

Curotto, E., Torres, G. y Aguirre, C. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso. (Patrocinio: Muñoz G.).

De la pulpa de la Cucurbita ficifolia (Alcayota) se purificó una enzima proteolítica; después de diferentes etapas de purificación aún se evidenció la presencia de actividad B-glucosidasa. La caracterización de las dos actividades enzimáticas mostraron que poseían el mismo peso molecular (60 Kd), igual estabilidad ante el pH (4-11) y temperatura (25-40º C).

El objetivo de este trabajo fue demostrar la presencia de una enzima multifuncional o una copurificación de la enzima B-glucosidasa y la enzima proteolítica.

La actividad B-glucosidasa se determinó frente al sustrato pNPG y la actividad proteolítica con azocolágeno como sustrato.

La determinación de la constante de inestabilidad a 55ºC (0,098 min-1) y la acción de inhibidores específicos (PMSF) indica que son dos proteínas diferentes que en las condiciones de purificación utilizada no se separaron.

Sin embargo, es posible la separación de la enzima B-glucosidasa utilizando cromatografía de exclusión en fracto gel TSK-HW-65 con fuerza iónica 0,5M. Etapas posteriores de cromatografía de intercambio iónico confirmaron la separación de estas enzimas.

Cuando la cromatografía de exclusión se realizó a una fuerza iónica menor, las dos actividades no se separaron y permanecen unidas incluso después de realizar cromatografía de intercambio iónico y de alta resolución (HPLC). Esto lleva a pensar que estas dos enzimas están asociadas en el fruto para cumplir su rol catalítico y pueden ser separadas a una fuerza iónica de 0,5M.

Proyecto DGI, Universidad Católica de Valparaíso.

258

DETERMINACION DE pKas DE GRUPOS IONIZABLES EN ENZIMAS MEDIANTE LA ECUACION DE SEGUNDO GRADO. (Determination of pKas of Ionizable Groups in Enzymes by Second Grade Equation).

O'Reilly S., Salinas D. y Riveros M.C. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso (Patrocinio: González-Lira G.).

El pKa de grupos ionizables en proteínas juega un rol esencial en su estabilidad y en su función. En enzimas, la determinación experimental del pKa de grupos catalíticos y su relación con la dependencia del pH de los parámetros cinéticos es un campo activo de investigación.

En este trabajo se propone el uso de un programa de regresión no lineal a la ecuación de segundo grado para el cálculo de los pKas de la enzima libre y de intermedios enzima-sustrato, como también de los parámetros cinéticos independientes del pH: V máx y Vmáx/Km, en sistemas enzimáticos que pueden ser tratados como ácidos dibásicos.

Trabajando con B-Glucosidasa de almendras, el tratamiento de los parámetros cinéticos dependientes del pH, obtenidos por regresión no lineal a la hipérbola, da por regresión no lineal a la parábola pK_{E1} = 4,7; pK_{E2} = 6,0 y Vmáx/Km = 7,35 E^{-3} min^{-1}, los valores bibliográficos de pK_E otenidos en condiciones semejantes son 4,8 y 6,2.

Aplicando este método a datos bibliográficos de K_2 ap/K_s ap (pH 7,21-8,71) de la quimotripsina se obtiene pK_{E1} = 6,77; pK_{E2} = 7,90 y k_2/Ks = 3920 1/(Mseg); los valores informados (método de Alberty) son 6,85; 7,95 y 3940 1/(M seg), respectivamente.

De acuerdo a los resultados el método propuesto es aplicable a sistemas diprótidos, permite trabajar en un rango estrecho de pH y es adecuado para sistemas enzimáticos con pKas de grupos catalíticos cercanos.

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

259

PROTEINASAS MULTIMERICAS EXOCELULARES DE *Frankia BR*, UN ACTINOMICETO FIJADOR DE NITROGENO ATMOSFERICO (Exocellular multimeric proteinases of *Frankia BR an actinomycete fixing atmospheric nitrogen*).

Schwencke J.[1,2], Muller A.[1,2], Benoist P.[1,2], y Dieu H.G.[2]
1) Lab. d'Enzymologie, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, Francia
2) Lab. de Biotechnologie des Symbioses Forestiéres Tropicales, ORSTOM/CTFT CIRAD, 45bis, Ave de la Belle Gabrielle, 94736 Nogent-sur-Marne, Francia.

Frankia pertenece a un grupo de bacterias Gram + capaces de endosimbiosis con plantas actinorízicas y de fijar el N-atmosférico tanto *in vitro* como *in-planta*. Los árboles actinorízicos, de rápido crecimiento, tienen interés económico como colonizadores de suelos arenosos, erosionados o en general pobres en nitrógeno asimilable.

Las características bioquímicas de *Frankia* son poco conocidas. Aislada recientemente (1978) crece con dificultad. Describimos aqui nuestras condiciones de crecimiento optimizadas y las principales características de su sistema proteolítico extracelular.

Nos interesan las proteinasas extracelulares de *Frankia* por el rol que puedan tener sea en su vida endosimbiótica, sea en el proceso de infección.

El análisis por SDS-PAGE de concentrados (DEAE/6PG) extracelulares muestra 63 polipéptidos. El "pattern" de proteínas secretadas cambia durante el crecimiento y depende de las condiciones de cultivo. Al menos 15-20 proteasas son secretadas. Entre ellas 6 aminopeptidasas y 8 proteinasas de alta masa molecular (1300-270 kDa). Las mismas están presentes en extractos intracelulares. Las características bioquímicas, de microscopía electrónica e immunológicas indican que la proteinasa multimérica de 1300 kDa (28 S) presenta semejanzas con la Megapaina (26 S) de eucariontes en tanto que aquella de 650 kDa (18 S) tienen similitudes con los prosomas o proteasomas (16 S) de células encariotas.

260

XILANASAS Y ACETIL ESTERASAS DEL HONGO *Penicillium purpurogenum*. (Xylanases and acetyl esterases of the fungus *Penicillium purpurogenum*). Scarpa, J., Belancic, A., Egaña, L., Steiner, J y Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, U. Católica de Chile, y Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Las hemicelulosas son un conjunto de heteroglicanos de la pared celular vegetal. Su componente principal es el xilano, constituído por una cadena de residuos de D-xilosa parcialmente acetilada y con ramificaciones de L-arabinosa y ácido metil D-glucurónico. En la hidrólisis del xilano, proceso de interés tanto en la naturaleza como en la industria biotecnológica, participan varias enzimas, (entre ellas xilanasas y acetil esterasas) cuyo número y mecanismo no es bien conocido. El objeto de este trabajo es el estudio de estas enzimas producidas por *P. purpurogenum*.

Se creció el hongo en un medio con paja de trigo como fuente de carbono (30 % de hemicelulosa) y medio de Mandels como fuente de nitrógeno y sales. A los 4 días de cultivo se obtuvieron sobrenadantes con 9,8 U/ml y 36,9 U/mg proteína de actividad xilanásica y 0,9 U/ml y 3,0 U/mg proteína de acetil esterasa. La cromatografía en gel P-100 de un concentrado del sobrenadante separa dos isoenzimas con actividad xilanásica. Una de ellas, xilanasa B, ha sido purificada a homogeneidad (cromatografía en DEAE-celulosa y CM-C50 y elución de un gel no desnaturante). La fracción A ha sido purificada parcialmente observándose por isoelectroenfoque al menos 2 actividades con distintos pI.

La xilanasa B es un monómero de 75.500 Da. Muestra máxima actividad para hidrolizar xilano de cáscara de avena a pH 5,0, y temperatura "óptima" de 50°. La xilanasa B es estable entre pH 4,0 y 7,0 y hasta 50°. Su punto isoeléctrico obtenido por isoelectroenfoque es de 5,9.

Financiamiento: Proyectos FONDECYT 89-580 y 90-0822 y UNIDO 91/065.

261

CARACTERISTICAS COMUNES Y DISTINTAS ENTRE APIRASAS DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL. (Common and distinct characteristic between animal and plant apyrases). Jorquera, O., Kettlun, A.M., Pieber, M. Depto. Bioquímica y Biol. Molecular, Fac. Cs. Químicas y Farm. Universidad de Chile.

Se ha descrito cinéticamente la presencia de ATP-difosfohidrolasa o apirasa tanto en tejidos animales como vegetales. Estas características corresponden a la acción hidrolítica sobre los substratos nucleosidos di- y trifosfatos con dependencia de catión bivalente. La función fisiológica de esta enzima, con actividad ATPásica-ADPásica, se relacionaría con el metabolismo extracelular de nucleotidos.

El presente trabajo muestra que además de estas características cinéticas comunes en enzimas de distinto origen hay similitudes en los posibles aminoácidos del sitio activo y en la existencia de epítopes comunes.

Los aminoácidos del sitio activo se estudiaron mediante modificadores químicos relativamente selectivos de grupos: tir, trp, -COO y -SH. En cuanto la interacción con anticuerpos contra la enzima vegetal, se encontró que sólo la fracción microsomal solubilizada de apirasa animal es inhibida por estos anticuerpos. En tejido animal la reacción de inmunowesternblot sólo es positiva en fracciones de membranas parcialmente purificadas; en cambio, en tejido vegetal se detecta a partir del extracto.

Aparte de características comunes hay también diferencias importantes entre las enzimas de origen animal y vegetal en cuanto a la unión a membranas, masa molecular y pI.

FINANCIADO POR PROYECTO FONDECYT 90-1006.

262

UNA FORMA GLICOSILADA DE ARGINASA RENAL HUMANA. (A glycosylated form of human kidney arginase). Torres,C., Silva,P., Oñate,E. y Carvajal, N. Depto. Biología Molecular, Facultad Ciencias Biológicas y Recursos Naturales Universidad de Concepción.

En este trabajo, se presentan evidencias que sugieren la presencia de especies glicosiladas de arginasa en el riñón humano. Apoyan esta conclusión los siguientes resultados: (a) la enzima es retenida muy fuertemente en una columna de Concanavalina A-Sepharosa, de la cual puede ser eluída en forma específica con glucosa o metil glucopiranosido; (b) la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 10% revela la presencia de una banda de proteína con actividad arginásica y que da un derivado fluorescente al ser sometida a una oxidación con peryodato y una posterior reacción con dansil hidrazina; (c) cuando la banda de proteína activa obtenida en el gel nativo es eluída del gel y luego sometida a una electroforesis en presencia de SDS, se observa una banda que corresponde a las subunidades de la enzima y que da reacción positiva con dansil hidrazina.

Los resultados obtenidos plantean una interrogante acerca del significado biológico de la modificación de la arginasa renal humana, lo que será analizado por nuestro grupo en el futuro. Por el momento, ellos sugieren una explicación para algunas observaciones anteriores de nuestro grupo. En efecto, con frecuencia se observa que preparaciones supuestamente purificadas de la enzima muestran una multiplicidad de bandas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, las que podrían explicarse por un grado variable de glicosilación.

Financiado por Proyecto FONDECYT 90-0261

263

Estudio de enzimas ligninolíticas del hongo *Ceriporiopsis subvermispora*. C. Ruttimann, L. Salas y R. Vicuña. Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile.

Los hongos de pudrición blanca son los más eficientes degradadores de lignina que se han descrito hasta la fecha. Por este motivo, también se han usado en experimentos de biopulpaje, demostrando ser eficientes y selectivos en este proceso.

En este trabajo hemos estudiado la producción de enzimas extracelulares por 5 cepas de *C. subvermispora*.

Se observó que este hongo produce una peroxidasa dependiente de Mn (MnP), lacasa y una actividad productora de H_2O_2. Estudios de especificidad de sustrato indican que esta última actividad podría deberse a la presencia de más de una enzima. En ninguna de estas cepas se encontró lignina-peroxidasa, que ha sido propuesta como la principal responsable de la degradación de lignina en otros hongos.

Se hizo un estudio de las condiciones óptimas para la expresión de estas enzimas, encontrándose que Mn^{+2} es necesario para la producción de las tres actividades, lográndose un máximo a concentraciones de 11 ppm, mientras que alcohol veratrílico (VerOH) no induce la producción de enzimas en estos hongos. El oxígeno tampoco influye en la producción enzimática, pero sí tiene un efecto positivo en la degradación de ^{14}C-DHPs. Con respecto al efecto de la concentración de nitrógeno en el medio, se ve una relación inversa entre la cantidad de MnP producida en cada caso y la mineralización de DHPs, lo que indica que podrían participar en este proceso otras enzimas aún no detectadas.

Trabajo financiado por proyectos Fondecyt Nº 824-90 y 0758-91.

264

DESARROLLO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTIADUCTO INDOL-FLAVINA (Development of monoclonal antibodies anti-adduct indole-flavine). Díaz, M.*, y Silva, E. Departamento de Química Biológica, Facultad de Química, P.Universidad Católica de Chile.

La ingestión de triptófano (Trp) y riboflavina (Rb) es esencial en la alimentación humana. Sin embargo, se ha reportado que la presencia simultánea de ellos en nutrientes parenterales y medios de cultivo expuestos a la luz visible genera hepato y citotoxicidad respectivamente. El descubrimiento de la formación de una unión fotoinducida entre Trp y Rb ha permitido explicar estos efectos+.

En este trabajo se contempló la obtención de anticuerpos monoclonales (AMC) anti-aducto indol-flavina con el propósito de tener una herramienta de detección y purificación de este compuesto ya sea en suero o en cualquier sistema biológico o químico. Para ello se generó fotoquímicamente la unión de Rb a residuos de Trp químicamente enlazados a residuos de ε-lisina de albúmina de suero bovino (BSA) y a hemocianina de loco (KLH).
Los sueros obtenidos después de inmunizaciones sucesivas de ratones Balb/c con la proteína modificada BSA-Trp-Rb se titularon mediante el test de ELISA. Se obtuvo una respuesta humoral significativamente mayor para BSA-Trp-Rb que para la proteína transportadora BSA. También se encontró una respuesta positiva para la proteína no relacionada con BSA, KLH-Trp-Rb que contiene el mismo hapteno.
Luego de efectuar una fusión somática para obtener hibridomas secretores de AMC contra el aducto, se obtuvieron una serie de clones que sólo reaccionan contra BSA-Trp-Rb y no contra BSA, lo que hace promisorios nuestros resultados.

+ Silva et al., Int. J.Vit. Nutr. Res. 58, 394 (1988).

Se agradece a CONICYT (Beca doctorado* y Proyecto FONDECYT).

265

DEGRADACION DE UN COMPUESTO MODELO DE LIGNINA TIPO DIARILETANO POR UNA BACTERIA FILAMENTOSA (Degradation of a diarylethane lignin model compound by a filamentous bacterium).

Nimrichsen, P. Laboratorio de Bioquímica, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Desde hace algunos años, en nuestro laboratorio se ha estado estudiando la participación de las bacterias en la degradación de la lignina. Hemos aislado y caracterizado numerosas cepas provenientes de diversas muestras ambientales, usando como única fuente de carbono y energía compuestos modelo del polímero.

En este trabajo se presenta el aislamiento y caracterización de la primera cepa capaz de crecer en el dímero no fenólico 2-fenilacetofenona, o desoxibenzoína (DB), un diariletano derivado de benzoína. La cepa, perteneciente al orden Actinomycetales, familia Actinoplanaceae, esporula fácilmente formando diplobacilos, y en medios adecuados forma hileras de varias células.

El análisis por TLC, HPLC y GC-MS de sobrenadantes de cultivo ha mostrado que la degradación comienza con dos hidroxilaciones sucesivas del anillo más lejano al grupo carbonilo, probablemente en las posiciones 3 y 4. Así también, se observa la formación transiente de fenol y de p-OH-bencil alcohol. Otro compuesto fenólico, aún no identificado, se acumula y se degrada más lentamente (R_f TLC, 0,49). Este compuesto no se forma al incubar las células con un inhibidor de dioxigenasas, como pirogallol (1 mM), al tiempo que se acumula fenol. Por el contrario, un inhibidor de monooxigenasas, como metirapona (100 μM), también produce acumulación de fenol pero no inhibe la formación del compuesto de R_f 0,49.

Basados en estos antecedentes, se propone una vía de metabolización en que la degradación del dímero procede a través de la ruptura de un anillo, como para los bifenilos, en lugar de entre los dos carbonos alifáticos, como acontece para otros compuestos tipo diariletano. Por otra parte, se está estudiando si la biosíntesis del fenol es a través de una reacción tipo Baeyer-Villiger, como ocurre en ciertas bacterias que degradan acetofenona.

Financiado por Proyectos FONDECYT # 0218-88 y 0758-91.

266

DEGRADACION DE COMPUESTOS MODELO DE LIGNINA POR UN CONSORCIO BACTERIANO PROVENIENTE DE " PALO PODRIDO".(Degradation of lignin model compounds by bacterial consortium from "Palo Podrido"). Céspedes, R. y Vicuña, R. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile
Palo Podrido es un fenómeno de delignificación selectiva que ocurre en muestras de madera en descomposición en los bosques del sur de Chile. Nuestro grupo se propuso estudiar la presencia de sistemas bacterianos con capacidades ligninolíticas en muestras de Palo Podrido.
Usando compuestos modelo de lignina y muestras de Palo Podrido en distintos estados de descomposición, se logró aislar un consorcio bacteriano compuesto en su totalidad por bacterias filamentosas, ocho en total, pertenecientes a las familias Actinoplanaceae, Dermatophilaceae y Streptomicetaceae.
Este consorcio, denominado PP6, a diferencia de las cepas que lo constituyen, crece y consume cuantitativamente varios dímeros de tipo β-O-4. Cuando cualquiera de estos compuestos está presente como única fuente de carbono y energía, no es posible detectar intermediarios de ruptura. No obstante, en presencia de antibióticos específicos, los cultivos del consorcio acumulan intermediarios que no son posteriormente metabolizados; así por ejemplo, al emplear veratrilglicerol-β-guaiciléter como sustrato más estreptomicina, se detectan acetoveratrona, ácido verátrico y guaiacol. Resultados similares aunque con menor eficiencia son obtenidos al emplear eritromicina, debido a que el consorcio es capaz de crecer a expensas de dicho antibiótico.
Nuestro grupo ha encontrado en *Pseudomonas* que acetoveratrona proviene de la degradación de β-hidroxipropioveratrona, el cual a su vez se forma de la ruptura directa del enlace éter. Aunque éste último compuesto no ha sido detectado en cultivos del consorcio, algunas de las cepas aisladas, así como el consorcio, rápidamente convierten β-hidroxipropioveratrona en acetoveratrona, sugiriendo que estas bacterias filamentosas también catalizan la ruptura directa del enlace intermonomérico. Este trabajo ha sido financiado por Grant UNIDO-ICGEB N°90/013 (CRP/CHI88-03) y Fundación Consorcio Nacional Vida.

267

EFECTO DE LA ANOXIA Y REOXIGENACION CELULAR: MODIFICACION DE PARAMETROS RELACIONADOS AL ESTRES OXIDATIVO EN HEPATOCITOS AISLADOS. (Cellular effect of anoxic and reoxygenation: Modification of oxidative stress-related parameters in isolated hepatocytes). Campos, R., Morgado, N., Sanhueza, J. y Valenzuela, A. Unidad de Bioquímica Farmacológica y Lípidos. INTA, U. de Chile.
El daño funcional por isquemia y reperfusión involucra la participación de formas activas del oxígeno y degradación de fosfolípidos de membranas. Nosotros ya demostramos que una isquemia/reperfusión tisular produce una respuesta típica de estres oxidativo (Free. Rad. Res. Comms. 10, 259, 1990). Ahora, en una suspensión de hepatocitos, en la que se evalua en forma controlada la expresión del estres oxidativo de un sistema con estructura celular intacta, sin la influencia sistémica de un organismo entero, se pretende estudiar la respuesta a un estres por anoxia/oxigenación y establecer el comportamiento de parámetros sensibles a este estres tales como: el glutatión reducido (GSH), sistema de xantina-oxidasa (XO) / deshidrogenasa, (XDH) y productos de la lipoperoxidación como el malondialdehido (MDA). Los resultados preliminares muestran que durante una oxigenación hay síntesis de GSH, generación de MDA, y actividades XO y XDH constantes, con XDH principalmente en el intracelular. Un régimen de anoxia muestra una situación semejante. Sin embargo, la oxigenación de la preparación anóxica, aún cuando no influye sobre XO y XDH, produce una disminución del GSH y un aumento del MDA. Se propone que la presencia o ausencia de oxígeno modifica los niveles de GSH y MDA, sin que al parecer durante el período de anoxia se produzcan cambios en las actividades XO y XDH. Financiado por FONDECYT (1194-90) y Programa de Estudios Avanzados. U. de Chile.

268

STATUS OXIDATIVO EN LA INGESTA DE ACIDOS GRASOS N-3: EFECTO DE LA EDAD Y DE UN ANTIOXIDANTE. (oxidative status after intake of N-3 fatty acid: aging and the effect of an antioxidant). Gárate,M., Otero,R. y Garrido,A. Unidad de Bioquimica Farmacológica y Lipidos. INTA, U. de Chile. (Patrocinio: M.A. Perreta)

La ingesta de aceites marinos ha sido reportada como beneficiosa para la salud humana. Su contenido de PUFA N-3, le otorgan propiedades antiateromatosas e hipocolesterolémicas. Sin embargo su incorporación en membranas biológicas provoca desorganización, aumento del riesgo de lipoperoxidación, pérdida de fluidez y alteración de actividades de enzimas unidas a ellas. Estos efectos no han sido estudiados en organismos envejecidos, como tampoco la protección que podría ejercer un antioxidante fisiológico como la vitamina E.

Ratas Wistar jóvenes (60 días) y envejecidas (18 meses), recibieron aceite de sardina española por 14 días, estabilizado con DL-α-tocoferol (1g/kg de aceite) y sin estabilizar. Se estudiaron: nivel de glutatión reducido (hepático, sanguineo y cerebral), capaci dad antioxidante del plasma, niveles de vitamina E (plasmáticos y eritrocitos) y actividad de enzimas unidas a membranas microsomales (glucosa-6-fosfatasa y 5'nucleotidasa). Los niveles de GSH disminuyen en estado fisiológico envejecido respecto a los juveniles en todos los tejidos estudiados. La capacidad antioxidante del plasma se incrementa en las ratas jóvenes que ingieren aceite, lo que no se observa en ratas envejecidas. Los niveles de vitamina E, caen a valores indetectables por ingesta del aceite y se recuperan si el aceite está estabilizado con α-tocoferol. Las actividades enzimáticas en las ratas jóvenes, disminuyen por efecto de los PUFA N-3. En los animales viejos, que tienen actividades más bajas que los jóvenes, hay un efecto estimulador de la vitamina E. Los PUFA N-3 son capaces de alterar importantes parámetros bioquímicos, en especial en estado envejecido y la vitamina E es capaz de ejercer un efecto protector frente a este riesgo. (Financiado por: Proyecto FONDECYT 952-89)

269

TRANSPORTE GASTROINTESTINAL DE FLUORURO Y MONOFLUOROFOSFATO: UN ENFOQUE CINETICO (Gastrointestinal transport of fluoride and monofluorophqsphate: a kinetic approach) Rosenkranz C. y Villa A. Unidad de Bioquímica Farmacológica y Lípidos. INTA, Universidad de Chile. (Patrocinio: E. Spencer).

La determinación del sitio principal de absorción a lo largo del tracto gastrointestinal y las condiciones que favorecen la absorción de fluoruro (F) y monofluorofosfato (MFP) revisten importancia dado que estos compuestos son utilizados en el tratamiento de la osteoporosis como agentes osteogénicos. En base a resultados previos obteni dos en nuestro laboratorio se consideró necesario estudiar la cinética de transporte de F y MFP en estómagos y duodenos de rata in-vitro. Estos tejidos fueron disectados, ligados e instilados con soluciones de F y MFP de concentración variable, en un medio Tyrode modificado y sumergidos en una solución externa de Tyrode a 37°C durante intervalos variables (2-120 min.). En cada experimento la cantidad de F iónico y total fueron determinados en las soluciones luminal, serosal y en el tejido, por medio de técnicas de electrodo específico de iones. De esta manera se obtuvieron las curvas cinéticas de transporte de F y MFP a través de los segmentos gastrointestinales estrofiados. Los resultados obtenidos permiten concluir a) que bajo las presentes condiciones experimentales la absorción duodenal de F y MFP es mucho mas rápida que la absorción gástrica. b) que el transporte intestinal de fluoruro ocurre por un mecanismo de difusión pasiva con una cinética de seudo-primer orden y que la especie involucrada en el transporte es fluoruro iónico. c) que el transporte duodenal de MFP ocurre según un mecanismo de reacción sucesivas de seudo-primer orden según el esquema

(A) $MFP \xrightarrow{k_1} F$ (mucosal) $\xrightarrow{k_2} F$ (serosal) en el cual $k_1 >> k_2$

Cuando se estudia el transporte duodenal de MFP en presencia de 50 mM de Calcio, los resultados preliminares sugieren que el mecanismo de transporte es similar al del esquema (A).

Financiado por Proyecto FONDECYT 1201-90

270

METABOLIZACION PEROXIDATIVA DE ACIDO INDOL-3-ACETICO CATALIZADA POR PEROXIDASAS (Peroxidative metabolization of indole-3-acetic acid catalized by peroxidases).

ESCOBAR, J. A. y CILENTO, G.
Departamento de Bioquimica,Instituto de Química,Universidad de San Pablo , Brasil

La metabolización peroxidativa del ácido indol-3-acético (hormona de crecimiento de vegetales),un importante proceso biológico,ha sido investigado por espectroscopia paramagnética electrónica (EPR),con la finalidad de obtener información sobre el mecanismo de generación de especies electrónicamente excitadas.

El radical skatol detectado durante la oxidación catalizada por peroxidasa de raíz fuerte (HRP),no está envolvido en el proceso principal de consumo de oxígeno o en la generación de oxígeno singulete.El espectro de quimiluminiscencia muestra varias bandas , que también son observadas cuando el éster etílico del ácido indol-3-acético es metabolizado por HRP o por leucocitos polimorfonucleares (PMNL),células ricas en mieloperoxidasa (MPO).

El espectro de EPR en la metabolización del éster etílico(en los sistemas con HRP o PMNL) , muestra un radical centrado en carbono terciario.Este radical participaría en el proceso de quimiexcitación/emisión , proceso éste responsable por la meyoría del consumo de oxígeno y de algunas de las especies emisivas, que serían originadas por la ruptura del enlace 2-3 del anillo indólico.

Otras células que contienen MPO , tambíen metabolizan éste substrato , pudiendo ser utilizado como una prueba quimiluminiscente intracélular para detectar la presencía de MPO.

Soporte financiero de FAPESP (Brasil), VOLSKWAGEN FUNDATION y GTZ (Alemania).

271

MODIFICACION DE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) ENRIQUECIDAS EN ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS W3 Y SU POSIBLE ROL ATEROGENICO. (Modification of LDL rich in W3 polyunsaturated fatty acids and its possible atherogenic role.). Montero,E., Guasch,V., Solis de Ovando,F., Skorin, C. y cols. Dep. Biología Celular y Molecular, Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile. (Patrocinio : F.Leighton)

Hay evidencias de que la modificación oxidativa de las LDL las convierte en una forma aterogénica, puesto que permite que sea captada por el receptor de aseo de los macrófagos, transformandose éstos en células espumosas características de la lesión arterioesclerótica inicial. En lesiones ateromatosas de humanos y animales se ha demostrado la presencia de LDL oxidada. La oxidación de las LDL se iniciaría con la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados que la conforman, de modo que la composición de ácidos grasos de la LDL sería determinante en la suceptibilidad de éstas a oxidarse. Actualmente se emplean aceites de pescado enriquecidos en ácidos grasos W3 en el tratamiento o prevención de la enfermedad coronaria ateromatosa, aceites que podrían tener un efecto adverso a nivel de daño oxidativo dado su alto grado de insaturación. En este trabajo evaluamos las LDL de sujetos sanos que fueron suplementados con aceite de pescado (6g W3/día por 15 días). No encontramos signos de daño oxidativo en las LDL plasmáticas y sí alta incorporación de W3. Como las LDL podrían oxidarse en el espacio subendotelial, estamos estudiando la suceptibilidad de estas a oxidarse *in vitro*, para ello mediremos degradación por macrófagos y productos de oxidación. (Proy.PNUD CHI/88/017, y Fondecyt 732/91)

272

EFECTO DEL AYUNO SOBRE EL METABOLISMO MICROSOMAL DE ACIDOS GRASOS. (Effect of fasting on fatty acids microsomal metabolism). **Orellana M., Fuentes O., Rosenblut H. y Valdés E., Dpto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, U. de Chile.**

El citocromo P-450 microsomal participa en el metabolismo de sustratos endógenos como prostaglandinas, ácidos grasos (AG), hormonas esteroidales, etc. Se han purificado isoenzimas P-450 específicas en hidroxilar AG en posición w y w-1. Se han formulado tres hipótesis acerca la finalidad de estas hidroxilaciones: sería una forma de excresión, tendrían un papel regulatorio o su objetivo sería el catabolismo lipídico. Se ha descrito que los AG w-hidroxilados por el cit. P-450 microsomal son posteriormente oxidados al ác. dicarboxílico correspondiente, sustrato de la β-oxidación peroxisomal.
Con el propósito de investigar el papel catabólico de la w y w-1 hidroxilación de AG, estudiamos el efecto del ayuno sobre los siguientes parámetros: metabolismo microsomal de ác. láurico, β-oxidación peroxisomal de AG, y fluidez de la membrana microsomal. Utilizamos ratas en ayuno de 24, 48 y 72 hrs y realizamos un estudio comparativo en hígado y riñón. En ambos órganos los resultados fueron similares; el metabolismo microsomal de ác. láurico aumentó a las 24 hrs. de ayuno, disminuyendo a las 72. El metabolito que se produjo en mayor proporción en todos los grupos estudiados fue el ác. w-hidroxi láurico. Resultados preliminares indican que el ayuno aumenta la β-oxidación peroxisomal de AG y altera la fluidez de la membrana microsomal.
Estos resultados apoyarían la hipótesis del fin catabólico de la w y w-1 hidroxilación microsomal de AG, especialmente en el hígado. Además el ayuno aumentaría el contenido o actividad de las isoenzimas P-450 específicas en hidroxilar AG en la posición w y w-1.
Financiado por proyecto DTI 3178/9013.

273

CARACTERIZACION DE LOS SITIOS DE FOSFORILACION OXIDATIVA EN MITOCONDRIAS *in situ* de *Trypanosoma cruzi*. (Characterization of the phosphorylation oxidative sites in mitochondria *in situ* of *Trypanosoma cruzi*). **Colomo-Torres (*), L., Palomino, A., Letelier, M.E. y Morello, A. (*) Departamento de Biología, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad De Chile.**

Los procesos bioenergéticos en los protozoos parásitos del género trypanosomatiadae presentan diferencias importantes respectos de los eucariontes superiores.
En el presente trabajo, se estudió el proceso de fosforilación oxidativa en *Trypanosoma cruzi* , utilizando mitocondrias *in situ* , obtenidas al permeabilizar las formas epimastigotas con digitonina.
En tales condiciones, glutamato + malato, que en eucariontes superiores son sustratos del complejo I, logran una relación ADP/O = 2. La misma relación se obtiene al adicionar succinato, lo cual significa que estos protozoos existen 2 sitios de fosforilación; uno de ellos corresponde a la citocromo oxidasa, como lo evidencia el uso de ascorbato como sustrato.
En trabajos previos hemos demostrado que el antioxidante fenólico BHA (2[3]-terbutil-4-hidroxianisol) inhibe el consumo de oxígeno, tanto en epimastigotes intactos como en células permeabilizadas, en el segmento coenzima Q-citocromo b de la cadena respiratoria mitocondrial. Esta inhibición es revertida , si luego del BHA, se adiciona ascorbato, lo que no ocurre al reagregar succinato; similares respuestas tienen estos sustratos luego de inhibir con antimicina A.
Por los resultados anteriores, hemos concluido que los sitios de fosforilación del *Trypanosoma cruzi*, corresponden a los sitios III y IV de las mitocondrias de mamíferos.

Financiado por : FONDECYT (Proyecto 91-1312), DTI-U. CHILE y SAREC

274

FUNCIONES PROTECTORAS DE GLUTATION Y TRIPANOTION EN *Trypanosoma cruzi*. (Protective functions of glutathione and trypanothione in *Trypanosoma cruzi*). **Repetto , Y., Lemus, S., Linchenca, I., Moreno, E., Díaz, E. y Muñoz, J.P.. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad De Chile.**

El *Trypanosoma cruzi*, es el agente causal de la tripanosomiasis americana. No existe una droga eficaz para prevenir o tratar esta enfermedad. Las drogas en uso, actúan sobre el parásito generando radicales libres y/o productos de reducción parcial del oxígeno.
El rol del glutatión (GSH) y del tripanotión (TSH_2, GSH + espermidina) es atrapar radicales libres a través de reacciones enzimáticas y no enzimáticas, produciéndose un intercambio de tiol-disulfuros y metabolismo de los peróxidos.
En este trabajo se presenta la participación del GSH y del TSH_2 frente a la acción de las drogas antichagásicas Nifurtimox (Nx) y Benznidasol (Bz) agregadas a cultivos de formas epimastigotas de las cepas Tulahuén (T) y Dm28c. También se estudió el efecto sobre los cultivos de la ciclohexilamina (CHA), inhibidor de la síntesis de espermidina, sola y junto a Nx o Bz.
Al tratar los parásitos con Nx, el GSH disminuye en un 36% y el TSH_2 en 54% en la cepa T y un 20% y 40%, respectivamente en la cepa Dm28c. En relación al Bz se produce un efecto ligeramente superior a lo observado con el Nx. Al adicionar CHA junto a Nx o Bz, hay mayor disminución en el contenido de GSH y TSH_2.
Se puede concluir que el GSH y el TSH_2 representan un mecanismo de defensa importante del parásito frente al estrés oxidativo. El mejor conocimiento del metabolismo de estos compuestos podría llevar al diseño de drogas antichagásicas específicas.

Financiado por : FONDECYT (Proyecto 91-1312), DTI-U. CHILE y SAREC

275

LOCALIZACION DE LA MITOCONDRIA EN *Trypanosoma cruzi* INTACTOS. (Localization of the mitochondria in intact *Trypanosoma cruzi*). **Aldunate, J., Ojeda, J.M. (*) y Spencer, P. (*) Unidad de Virología, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad De Chile.**

El protozoo *Trypanosoma cruzi* posee una única mitocondria, la cual se distribuye con prolongaciones y ramificaciones a toda la célula.
Para visualizar la mitocondria y establecer los cambios en su morfología y su funcionalidad, se incubaron formas epimastigotas y tripomastigotas intactas y permeabilizadas con digitonina, con el fluorocromo RODAMINA 123.
Este fluorocromo se une preferencialmente a la mitocondria en células viables, probablemente por ser un colorante catiónico y mantener el organelo un alto potencial transmembrana.
Los resultados obtenidos, muestran que ambas formas del protozoo incorporan la Rodamina y permite visualizar la mitocondria del parásito en forma completa, lo mismo se logra con células permeabilizadas con digitonina, incubadas en un medio con succinato y ADP, evidenciándose un "redondeamiento" de las células.
En trabajos previos hemos demostrado que el antioxidante fenólico BHA (2[3]-terbutil-4-hidroxianisol) inhibe el consumo de oxígeno, tanto en epimastigotes intactos como en células permeabilizadas, en el segmento coenzima Q-citocromo b de la cadena respiratoria mitocondrial. Al agregar BHA a las diferentes formas celulares, se inhibe la incorporación de Rodamina, lo cual nos sugiere que la incorporación del fluorocromo requiere de la fosforilación oxidativa del *Trypanosoma cruzi*.

Financiado por : FONDECYT (Proyecto 91-1312), -DTI-U. CHILE y SAREC

276

INDICES DE ESTRES OXIDATIVO (EOX) EN HIGADO Y ERITROCITOS DE RATAS TRATADAS CON LINDANO (L). (Rat liver and red blood cell indexes of oxidative stress after lindane treatment).

Bainy,A.C.D.,Azzalis,L.,Rodrigues,F.,Simizu,K.,Barros,S.B.M.*,Videla,L.A.** y Junqueira,V.B.C. Instituto de Química y *Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Sao Paulo, y Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Dosis únicas de L inducen un EOX hepático en ratas, caracterizado por un aumento en la generación microsomal de radical superóxido ($O_2^{\cdot}$) dependiente del citocromo P-450 asociado a su metabolización, y de los niveles de lipoperoxidación (LP). Este EOX resultó ser un fenómeno bifásico, involucrando marcadas modificaciones en el metabolismo hepático del glutatión. Además, el L provoca alteraciones enzimáticas y funcionales asocidas a membranas eritrocitarias que podrían involucrar una acción prooxidativa del insecticida, importante modelo experimental para el estudio de la producción y reactividad de radicales libres de xenobióticos.

El presente trabajo muestra los resultados de un estudio comparativo sobre índices de EOX hepático y eritrocitario en ratas sometidas a la ingesta de 1000 ppm de L en la dieta, por 60 y 90 días. Se observó un efecto prooxidante del L a nivel hepático desde los 60 días de tratamiento, caracterizado por un incremento de la LP junto con una disminución de la relación $SOD/O_2^{\cdot}$, índice indicativo de EOX celular. Estos parámetros no fueron alterados a nivel eritrocitario, lo cual sugiere que las acciones del L en este modelo estarían relacionadas a interacciones a nivel membrana por la naturaleza lipofílica del xenobiótico, y que su biotransformación es necesaria para el desarrollo de EOX,como ocurre el el hígado. (FAPESP, CNPq, FONDECYT (1109/91) y DTI-U.Chile (B3241-9013)).

277

EFECTO DE AGENTES DIABETOGENICOS EN EL METABOLISMO HEPATICO DE DROGAS EN RATAS (Effect of diabetogenic agents on drug metabolism in rats).

Mancilla, J,. Vega, P., Gaule, C. y Del Villar, E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: Orellana, M.)

Aloxano (A) y Streptozotocina (STZ) son conocidos agentes diabetogénicos experimentales que determinan un estado patológico de hiperglicemia con síntomas de poliuria , polidipsia y polifagia en el animal de experimentación. Sin embargo, existen discrepancias en relación a la potencia de la acción tóxica de estos compuestos.

Por las complicaciones fisiopatológicas y metabólicas que se desarrollan en el estado de diabetes, es de interés conocer el metabolismo de los fármacos en dicho estado.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos por efecto de la diabetes inducida por A y STZ y la administración de insulina en el metabolismo oxidativo in vitro de estructuras moleculares modelos, en ratas Wistar.

Conjuntamente con los parámetros fisiológicos en el estado de diabetes se muestran las alteraciones metabólicas en el metabolismo de aminopirina (AP) y testosterona (T) y las propiedades de unión de un ligando modelo a microsomas hepáticos de ratas controles, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina.

Con ambos agentes diabetogénicos se obtuvo 100% activación de la enzima monoxigenasa dependiente del citocromo P-450 sin variación en la Km de la reacción (2.0 m M) para AP, en cambio hay diferencias importantes para el sustrato testosterona.

Sin embargo sólo los microsomas de ratas con diabetes por STZ presentaron un sistema anormal de unión determinado por el espectro diferencial por sustrato.

Se relacionan y discuten las variaciones en el contenido de cit P-450 y la afinidad del sistema microsomal con la actividad catalítica del sistema de monoxigenasas.

PROYECTO N° 2666 - 9044 DTI, y
PROYECTO N° 1269-91 FONDECYT.

278

Síntesis de Acil-Coenzimos A de drogas hipolipidémicas por hepatocitos aislados. (Synthesis of acyl-Coenzyme A of hypolipidaemic drugs by isolated hepatocytes).

Cárdenas,L., Morales, M.N. y Vargas,L. Fac. Cien. Biol., Depto. Biol. Cel. & Molec. P.U.Católica de Chile.

Las drogas hipolipidémicas pertenecientes a la familia del clofibrato, así como compuestos estructuralmente no asociados como herbicidas, plastificantes, y otros contaminantes ambientales, causan importantes alteraciones hepáticas en animales de experimentación, entre las que destacan proliferación de organelos y tumorigénesis. Trabajos previos de nuestro grupo indican que estos compuestos son activados a acil-CoAs por una acil-CoA sintetasa inespecífica. La ausencia de correlación existente entre la estructura química de estos compuestos y su actividad biológica nos han llevado a sugerir que la especie farmacologicamente activa comun son los derivados acil-CoAs. Dado que la formación de estos compuestos *in vivo* no ha sido caracterizada en detalle, en este trabajo se determinó la concentración de uno de estos acil-CoA anómalos (ciprofibroil-CoA) en hígado de ratas tratadas con ciprofibrato. Además, se estudió comparativamente el curso temporal de formación de acil-CoAs de tres drogas hipolipidémicas por hepatocito aislados, su dependencia de la concentración de droga, y el efecto que tienen compuestos potencialmente capaces de alterar su formación, como ácido palmítico y carnitina. Los resultados muestran que los tres compuestos forman acil-CoAs en hepatocitos aislados y que la adición de carnitina aumenta su concentración intracelular, mientras que el ácido palmítico inhibe parcialmente su formación. Se muestra además que el hígado y las plaquetas humanas también son capaces de formar acil-CoAs de drogas (Financiamiento; Fondecyt 802/90).

279

Efecto del ciprofibrato, un carcinógeno no-genotóxico, en la fosforilación del Receptor del factor de crecimiento epidermal (R-EGF) en hepatocitos aislados. Rol de proteína quinasa C (Effect of ciprofibrate, a non-genotoxic carcinogen, in the phosphorylation of the EGF-R in isolated hepatocytes. Role of protein kinase C).

Hidalgo,P.C., Orellana, A y Bronfman, M. Fac.Cien.Biol, Depto. Biol. Cel. & Molec., P. U.Católica de Chile.

El ciprofibrato y otros hipolipidemiantes así como diversos compuestos no relacionados estructuralmente, como agroquímicos y plastificantes, inducen respuestas similares en el hígado de animales tratados, las que incluyen proliferación de organelos y tumores. Estos compuestos no son mutagénicos, y han sido clasificados como carcinógenos no genotóxicos. Trabajos previos nos han permitido sugerir que los ésteres de estos compuestos con el Coenzimo A, derivados que se forman tanto *in vivo* como *in vitro*, podrían ser las substancias activas de estos compuesto. *In vitro* ellos potencian la actividad de la proteína quinasa C (pqC), enzima clave en la regulación de un número importante de fenómenos celulares, los que incluyen diferenciación y tumorigénesis. En este trabajo se estudió el efecto del ciprofibrato en la fosforilación del R-EGF en hepatocitos aislados. Este receptor, con actividad autofosforilante en tirosina, ha sido también involucrado en fenómenos de diferenciación y tumorigénesis. La fosforilación del R-EGF por pqC cambia la afinidad del receptor por EGF. En este trabajo se muestra que el grado de fosforilación del R-EGF en hepatocitos aislados, pre-incubados con P_{32}, aumenta en presencia de ciprofibrato y que la fosforilación del R-EGF purificado por pqC se incrementa en presencia de cipro-fibroil-CoA, mientras que el ciprofibrato no tiene efecto. Por otra parte, se encontró que, *in vitro*, ninguno de los compuestos cambiaba la auto fosforilación del R-EGF inducida por EGF. Estos resultados sugieren que el ciprofibroil-CoA, producido metabolicamente, es el responsable del aumento en la fosforilación del R-EGF inducida por ciprofibrato en hepatocitos aislados. (Financ. Fondecyt 802/90).

280

MODULACION HORMONAL DE LA PROTEINA KINASA C (PKC) MAMARIA DE RATA. (Hormonal modulation of protein kinase C (PKC) in rat mammary tissue. Foncea R., Moncada E. (Patrocinio: S. Lavandero). Depto Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

La activación de proteínas kinasas por la acción coordinada de hormonas y factores de crecimiento es esencial en el desarrollo del tejido mamario.

En este trabajo se evaluaron los cambios de la PKC mamaria en el ciclo lactogénico, en cuanto a su actividad, distribución subcelular y su regulación por hormonas esteroidales y prolactina.

Se utilizaron ratas en distintas etapas del ciclo lactogénico y hembras vírgenes ovariectomizadas (250g) que recibieron reposición hormonal secuencial de estradiol y progesterona en dosis de 2 ug y 6 mg/rata/día, respectivamente,entre los días 1 y 20 (pseudopreñez) y domperidona, que aumenta la prolactina plasmática, 1 mg/rata/día (pseudolactancia). Se determinó la actividad de la PKC en el extracto semipurificado de las fracciones soluble y particulada de la glándula mamaria.

Nuestros resultados indican que la PKC mamaria alcanza un máximo en la mediana preñez y un mínimo en la mediana lactancia, con una distribución subcelular predominante característica : citosólica en la preñez y particulada en la lactancia. La pseudopreñez y pseudolactancia reprodujeron lo observado en el ciclo lactogénico natural.

Se concluye que la actividad y distribución de la PKC mamaria es dependiente de estrógenos, progesterona y prolactina.

* FONDECYT 91-0879 y 91-0880, DTI B-3113-9013 y Postgrado U. Chile 91-001.SL es becado de Fundación Andes. (Participan también en este trabajo M. Sapag-Hagar y S. Lavandero).

281

PROTEINAS KINASAS A Y C EN EL DESARROLLO DE LA HIPERTROFIA CARDIACA EXPERIMENTAL.*(Protein kinases A and C during the development of experimental heart hypertrophy). Cartagena,G., Jalil, JE., Corbalán, R., Sapag-Hagar, M. Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas,U. de Chile y Depto. Enferm. Cardiovasc, Fac. Medicina, P.U.Católica de Chile.

La hipertrofia cardíaca (HC) puede considerarse como crecimiento celular anormal en que intervienen diversas hormonas y factores de crecimiento cuyos sistemas de transducción, a través de proteínas kinasas (PK) y la consecuente fosforilación de proteínas funcionales y estructurales, constituyen importantes mecanismos de regulación en el corazón.

En este trabajo se evalúan las actividades de las PK dependientes de AMP cíclico (PKA) y de Ca^{2+} y fosfolípidos (PKC) en el desarrollo de la HC. Se utilizó como modelo de HC la fístula aorto-cava en ratas, obteniéndose a partir del día 7 aumentos significativos de la masa cardíaca ($p < 0,05$). Las actividades de PKA y PKC se determinaron por la incorporación de ^{32}P a un sustrato proteico, en los días 2, 7, 21 y 56. La PKA (U/g) mostró diferencias significativas ($p < 0,005$) desde el día 2 hasta finalizar el estudio. Los incrementos en su actividad, para los días analizados, fueron aproximadamente de 3, 9, 8 y 4 veces,respectivamente, en relación a sus controles (pseudoperadas). Por otra parte, la actividad total de PKC (U/g) sólo presentó diferencias desde el día 7 ($p < 0,01$), observándose en todos los casos aumentos de 2 veces, respecto de sus controles.

Estos resultados indican la importante participación de los procesos de fosforilación por proteínas kinasas en el corazón durante el desarrollo de la hipertrofia cardíaca.

*Fondecyt 90-0712 y 90-0722. (Participaron también en este trabajo S Lavandero y R Foncea).
SL es becado de Fundación Andes.

282

MUCOPROTEINAS EN BILIS DE PACIENTES CON COLELITIASIS : INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON INDOMETACINA. (Mucoprotein in gallstone patients : Influence of the treatment with indomethacine). Del Pozo, R. , Jüngst, D. y Paumgartner, G. Depto. Medicina Interna II, Clínica Grosshadern, Universidad de Munich, Munich (R.F.A.).

Se ha descrito una relación entre un incremento en la producción de mucoproteínas en la vesícula biliar y la formación de cálculos vesiculares. La indometacina (INDO), como inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, podría disminuir la producción de mucoproteínas. Por ello estudiamos el efecto de la INDO sobre el contenido de mucoproteínas, viscosidad, índice de saturación (CSI) y el tiempo de nucleación en bilis vesicular de A) pacientes colecistectomizados previamente tratados 7 días con INDO (75 mg/día) B) pacientes colecistectomizados sin previo tratamiento (control), y C) pacientes sin cálculos ("Normal").

Resultados :

	Viscosidad (mPa)	CSI	Mucoproteínas (mg/ml)
A)INDO (6)	2.2 ± 0.8	1.5 ± 0.3	16.3 ± 3.3
B) Control (10)	3.9 ± 0.6	2.1 ± 0.6	18.2 ± 4.3
C)"Normal" (4)	3.5 ± 2.1	0.9 ± 0.3	9.4 ± 4.7

Conclusiones :

La INDO disminuye principalmente la viscosidad y el CSI, observándose una tendencia hacia una disminución en la concentración de mucoproteínas en la bilis.

Estos resultados pueden contribuir a la probable utilización de la INDO como una terapia adicional luego de practicada una litotripsia y/o tras una administración oral de sales biliares en pacientes con colelitiasis.

(Proyecto financiado por el DAAD)

283

PRESENCIA DE PFK Y ACTIVIDAD GLICOLITICA DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE Xenopus laevis. (PFK activty and glycolytic flux during early development in Xenopus laevis) Kessi, E., Guixé, V., Herrera, R. y Ureta I. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, U. de Chile. Departamento de Cs. Biol. Animales, Facultad de Cs. Vet. y Pecuarias, U. de Chile.

En los oocitos de anfibio, el metabolismo de la glucosa se encuentra restringido principalmente a la síntesis de glicógeno y al ciclo de las pentosas. La glicolisis, la gluconeogénesis y la glicogenolisis, no son funcionales en los oocitos desde el estadio I hasta el estadio VI. Tradicionalmente la carencia de actividad glicolítica se ha atribuido a la ausencia de actividad de fosfofructoquinasa, una enzima considerada clave en la regulación de esta vía. Debido a nuestro interés en determinar en que momento del desarrollo aparece la actividad glicolítica, hemos estudiado la producción de CO_2 a partir de 1-^{14}C glucosa y de 6-^{14}C glucosa en oocitos de Xenopus laevis, en diferentes estadios, como también en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Además hemos determinado inmunologicamente la presencia de la enzima y medido su actividad in vitro.

Para medir la producción de $^{14}CO_2$ los oocitos de diferentes estadios se incubaron con 1-^{14}C glucosa, o 6-^{14}C glucosa 2 mM, durante 30 minutos. La presencia de PFK en los extractos se detectó transfiriendo las proteínas a nitrocelulosa y permitiendoles luego reaccionar con un anticuerpo purificado anti-PFK de músculo de X. laevis. La actividad enzimática se midió espectrofotométricamente siguiendo la oxidación de NADH usando un ensayo acoplado.

La producción de $^{14}CO_2$ a partir de 6-^{14}C glucosa sugiere una activación de la glicolisis a nivel de la etapa de gástrula, aún cuando la presencia de la enzima puede detectarse inmunológicamente desde el estadio I en adelante. (Proyecto FONDECYT 91-0829)

284

REGULACION DE LA ß-OXIDACION PEROXISOMAL. ESTUDIO DEL EFECTO DE MALONIL-CoA Y 2-TETRADECILGLICIDIL-CoA (TDGA-CoA) SOBRE CARNITINA OCTANOILTRANSFERASA (COT) PURIFICADA DE HIGADO DE RATA. (Regulation of Peroxisomal ß-oxidation. Study of Malonyl-CoA and TDGA-CoA effect on rat liver COT.) Rojas,S., Necochea,C., Leighton,F. y col. Dep. de Biología Celular y Molecular, Universidad Católica de Chile.

Los mecanismos de regulación de la ß-oxidación de ácidos grasos en peroxisomas no han sido definidos. En mitocondrias la ß-oxidación es regulada a través de la carnitina palmitoiltransferasa-I (CPT), por malonil-CoA que la inhibe reversiblemente, constituyendo así un regulador fisiológico. Se ha visto que el TDGA (inhibidor supuestamente específico para CPT-I), produce en hepatocitos aislados una marcada disminución de la ß-oxidación mitocondrial, y un aumento significativo de la ß-oxidación peroxisomal de ácidos grasos de cadena mediana y larga. El estudio de la sensibilidad a TDGA-CoA de las diferentes transferasas en hepatocitos incubados en presencia de la droga, muestra una aparente inhibición de la COT en un 51% . Estos y otros argumentos nos han llevado a postular para COT un papel regulador de la ß-oxidación peroxisomal. Para evaluar los antecedentes que apoyan la existencia de un rol regulador de la COT en la B-oxidación peroxisomal, se purificó la enzima a partir de hígado de ratas tratadas con ciprofibrato, y se estudió sobre ella el efecto de malonil-CoA y TDGA-CoA. Se comprobó que efectivamente la COT se inhibe en forma rápida e irreversible con el TDGA-CoA, a razón molar inhibidor/enzima cercana a 1. Estos resultados, junto al efecto observado de TDGA en hepatocitos aislados y las características de la inhibición por malonil-CoA, nos llevan a reafirmar el posible papel regulador de la enzima, mediante el control de la exportación al citosol de derivados acil-CoA de cadena mediana producidos por la ß-oxidación peroxisomal. (Financiado por Juvenile Diabetes Foundation Int. y FONDECYT 717/90).

285

CARACTERIZACION DE LA UNION DE CALCIO A LOS FRAGMENTOS C-TERMINAL DE TUBULINA.(Characterization of calcium binding to tubulin C-terminal fragments). Barros, L.; Lobos, S. y Lagos, R. Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

La tubulina, pertenece a la familia de proteínas que unen calcio y nucleótidos de guanina. Esta proteina es un heterodímero de masa molecular 110 kDa, formada por 2 subunidades llamadas α y ß, ambas de masa molecular 55 kDa. Posee 2 sitios de unión para GTP por dímero, uno intercambiable. En nuestro laboratorio se ha determinado que la inhibición de la polimerización y la despolimerización de microtúbulos inducida por la unión de calcio, es acompañada por la hidrólisis del fosfato gamma del GTP intercambiable.

Se digirió tubulina de cerebro de pollo con subtilisina y se determinó que la unión de calcio a los péptidos C-terminal era cooperativa con un coeficiente de Hill de 1,6, en el equilibrio, se encontraron 1,65 ± 0,58 sitios de alta afinidad, con una Kd = 1,83 x 10^{-8} M. Se realizó la predicción de estructura secundaria de esta zona, para diferentes isoespecies de secuencia conocida, utilizando los métodos de Chou y Fasman y el de los perfiles de hidrofobicidad. Se postula que los fragmentos C-terminal de α-tubulina, estarían formados por una α-hélice y una zona con estructura al azar y los de ß-tubulina por 2 α-hélices, unidas por una zona con estructura al azar.

Con el propósito de determinar si la unión de calcio a la región C-terminal requiere de una estructura de 2 α-hélices unidas por una secuencia al azar, similar a la conformación HLH de proteínas que unen calcio, se obtuvo en E. coli un péptido de fusión, que corresponde a los últimos 52 aminoácidos del C-terminal de la ß-tubulina de cerebro de pollo, y se purificó para caracterizar la unión de calcio.

Financiado por proyecto FONDECYT 1133/89.

286

IMPORTANCIA DE LA HIDROLISIS DE GTP EN EL MECANISMO DE INHIBICION DE LA POLIMERIZACION DE TUBULINA Y DESPOLIMERIZACION DE MICROTUBULOS POR CALCIO. (Role of the GTP hydrolysis into the mechanism of tubulin polymerization inhibition and microtubule depolymerization by calcium).

*Soto, C. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La tubulina, un heterodímero globular de 110 KDa, es capaz de autoensamblar in vitro formando microtúbulos en presencia de GTP, mientras que GDP inhibe este proceso. La tubulina contiene dos sitios para los nucleotidos de guanina: el sitio intercambiable (E) y el no intercambiable (N). Calcio interactúa in vitro con la tubulina inhibiendo su polimerización y despolimerizando los microtúbulos previamente formados.

Para investigar si la hidrólisis del GTP unido al sitio E de la tubulina participa en el mecanismo de acción de calcio, estudiamos la hidrólisis del fosfato gama usando [γ-^{32}P]-GTP. Calcio estimuló significativamente la actividad GTPásica de tubulina en solución. Las constantes de semisaturación para la estimulación de la actividad GTPásica por Ca(II), para la saturación de los sitios de unión de Ca(II) de alta afinidad y para la inibición de la polimerización de tubulina, definidas como la concentración de calcio necesaria para lograr el 50 % del efecto máximo, resultaron tener valores similares. Sodio, magnesio y terbio no estimularon la actividad GTPásica de tubulina. Calcio, en concentraciones inhibitorias, no tuvo efecto sobre la polimerización de tubulina incubada con análogos no hidrolizables de GTP. Los resultados obtenidos permiten plantear la hipótesis que en el mecanismo de inhibición de la polimerización de tubulina y despolimerización de microtúbulos por calcio estaría involucrada la hidrólisis del GTP unido a tubulina.

*Financiado por proyectos FONDECYT 1133-89 y 0043-90. Becario Fundación Andes.

287

ESTABILIZACION DE LA PROTEASA DE C. FICIFOLIA. (Stabilization of C. ficifolia protease). González-Lira G. y González C. Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.

El objetivo es termoestabilizar la proteasa de la pulpa de la alcayota, por medio de la adición de solventes de tipo alcohol. Se determinaron las constantes de inactivación en tampón y en solventes al 10% (v/v). Por espectroscopía de absorción se midió si una modificación estructural de la proteasa contribuyó a su termoestabilización. Se midió la actividad proteásica con Azocoll en tampón fosfato, pH 8,0. Se determinaron velocidades a distintas temperaturas.

En solución acuosa a 20 y 40ºC permanece estable y la actividad no sufre variación. A los 60ºC se desnaturaliza y pierde hasta el 60% de su actividad inicial a las 3 horas.

Con glicerol a los 20 y 40ºC la actividad se mantiene constante, a los 60ºC la actividad aumentó en un 33% y luego se mantuvo constante hasta por lo menos 3 horas.

Con sorbitol la actividad fue decayendo paulatinamente en el tiempo. Lo mismo ocurrió con 1,3- propanodiol. Para el manitol se observó también un efecto estabilizante hasta las 3 horas, sin embargo, la actividad de la enzima decayó al principio en un 30%, para luego mantenerse constante.

Al comparar el espectro de absorción en tampón y en presencia de glicerol, se observa diferencias en el rango UV, lo que puede interpretarse como un cambio estructural promovido por el solvente.

288

ASPECTOS EVOLUTIVOS Y RELACIONES ESTRUCTURA/FUNCION DE TOXINAS DE ESCORPION DETERMINADOS A PARTIR DE SUS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES

J. C. Fontecilla Camps

Laboratoire de Cristallographie et Cristallisation des Protéines, DSV/LIP
Commisariat à l'Energie Atomique
Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble 85x
38041 Grenoble Cedex FRANCIA

Las toxinas de veneno de escorpion son proteinas de bajo peso molecular (alrededor de 7000 Da) que se unen de manera específica a los canales de sodio del sistema neuromuscular. La actividad neurotóxica de estas moléculas tiene su origen en la modificación de la permeabilidad de los canales, lo que provoca a nivel del organismo una verdadera tormenta adrenergica. Un estudio mas detallado a mostrado que, en función del origen geográfico del escorpión, las toxinas puede dividirse en dos grupos, alfa y beta, según si provocan una prolongación de la fase de inactivación de la corriente de sodio o afectan la activación de esta corriente, respectivamente. También de ha demostrado que estos dos tipos de moléculas no se fijan en el mismo sitio sobre el canal a pesar de presentar una homología de secuencia primaria bastante elevada. Ademas, las toxinas de escorpión pueden presentar una gran especificidad con respecto a ciertos animales. Por ejemplo, en el veneno de *Androctonus australis* Hector de Norafrica se han descrito moléculas que solo reaccionan contra los insectos, otras con especificidad contra los crustáceos, mamíferos, etc. Nuestro trabajado se ha centrado sobre el estudio cristalográfico de dos toxinas, la variante 3 de *Centruroides sculpturatus* Ewing de Arizona y la toxina II de *A. australis* Hector (1,2) Ambas estructuras han sido determinadas a alta resolución (1,8 Å) y son representativas de los grupos beta y alfa respectivamente. La zona activa en estas dos moléculas ha sido localizada de manera tentativa gracias a los resultados de estudios de modificación de amino acidos y de determinación de secuencias primarias. La conclusión mas importante es que existe en estas moléculas una zona o nucleo muy conservado y que el tipo de actividad esta determinado por la orientación de regiones que se proyectan de esta zona. También hemos modelizado la estructura de una toxina anti-insecto; estos resultados preliminares confirman lo observado en el caso de la toxina II y la variante 3

1.- Fontecilla-Camps, J.C. , Almassy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D., y Bugg, C.E. " Three-dimensional structure of a protein from *scorpion venom*: A new structural class of neurotoxins" (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6496-6500

2.- Fontecilla-Camps, J.C., Habersetzer-Rochat, C. y Rochat, H. "Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion Androctonus australis Hector" (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7443-7447

289

UTILIZACION DE UN NUEVO ENFOQUE EN LA CURA DE LA SHIGELLOSIS (Use of a new inhibitor to overcome the Shigellosis). Campos, M., Bocaz, G., Vásquez, O., González, H., Cáceres, J. y Yañez, C. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción.

Las β-lactamasas (penicilin amido β-lactam hidrolasas, E.C.3.5.2.6) son el mecanismo de resistencia a antibióticos β-lactámicos más relevantes en clínica. Nosotros hemos estudiado estructuralmente la enzima proveniente de Shigella flexneri UCSF-129, cepa patógena productora de graves cuadros diarreicos -principalmente- a la población infantil. El objetivo fundamental de este trabajo, es encontrar su inhibidor óptimo para recuperar la acción terapéutica de las penicilinas y cefalosporinas, que son de elección en un sin número de enfermedades infecciosas y son de bajo costo relativo. In vitro, se ensayó el nuevo inhibidor BRL 42715, (C_6-(N1-metil-1,2,3 triazolilmetilen)penem, por medio de dos parámetros: I_{50} (concentración del inhibidor necesaria para disminuir en un 50% la actividad enzimática) y CMI (mínima concentración de antibiótico capaz de detener el desarrollo bacteriano, en presencia del inhibidor). Los resultados mostraron que la inhibición fue irreversible, siendo el I_{50} de 0,0049µg/ml. Este valor es 20 veces más bajo que el mejor inhibidor (6-β-yodopenicilánico) informado por nosotros anteriormente. Reduce el CMI de ampicilina de 2048µg/ml a 2µg/ml. Es decir se obtiene una reducción en la dosis efectiva del antibiótico en 1024 veces, con una concentración de BRL 42715 de 0,196µg/ml y el sinergismo perdura durante 9 hrs.

Financiado por Proyecto D.I. 20.13.84 y Beecham Pharmaceutical.

290

GEL-PERFECT : GELES UNIDIMENSIONALES. UN NUEVO METODO DENSITOMETRICO PARA COMPUTADORES PERSONALES.
(Gel-Perfect for unidimensional gels, a new densitometric method to be used in personal computers).

Bozzo, S., *Retamal, C.. Departamento de Medicina Experimental e *Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile; Santiago 7 - Chile.
(Patrocinio : E. Egaña.).

En el análisis de geles de poliacrilamida existen variados métodos de detección y cuantificación de proteinas que utilizan colorantes especificos como azul de coomassie, amido-black, impregnaciones argénticas entre otras; con posterior lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda apropiada.

Un grupo de proteinas de masa molecular conocida se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% en condiciones desnaturantes (SDS), y se analizaron los canales en un densitómetro tradicional a 595nm.

Paralelamente se utilizó un nuevo concepto de análisis de bandas de proteinas en geles, que se basa en un proceso interactivo de imágenes por computación. Los geles se digitizaron mediante un scanner "Geniscan GS 4500", que permite la obtención de imágenes de 100 a 400 puntos por pulgada, equivalente a 63,5 o 254 micrones por pixel. Posteriormente durante el análisis, esta densidad se reduce de 190,5 a 762 um en 10 niveles de absorción. Utilizando un programa comercial estas imágenes son registradas, generadas con color artificial y grabadas para su posterior procesamiento. El programa requiere de un computador XT o AT con tarjeta EGA o VGA color y scanner.

Se determinaron los valores de movilidad relativa, masa molecular relativa y se cuantificaron cada una de las bandas de proteinas.

Este nuevo método permite analizar todos los canales de un gel sin romperlo y con mayor precisión, si se compara con las técnicas tradicionales. Se pueden comparar dos o mas densitogramas (sustracción electrónica).

Esta técnica ademas de ser altamente resolutiva y fácil de realizar, permite almacenar imágenes e información para futuras comparaciones entre las proteinas.

El programa se distribuira entre los investigadores a un costo nominal.

291

GENOTOXICIDAD DE EXTRACTOS ORGANICOS OBTENIDOS DEL MATERIAL PARTICULADO DEL AIRE DE SANTIAGO EN LOS MESES DE MAYOR CONTAMINACION DE 1990 Y 1991. (Genotoxicity of organic extracts obtained in 1990 and 1991 from Santiago airborne particles during the months of higher air pollution). Vignolo, P., Adonis, M., Silva, M. and Gil, L. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Diversos estudios realizados en diferentes paises, en ciudades con alta contaminación atmosférica, indican que existen en el aire cientos de compuestos tóxicos para la salud humana, los cuales presentan alta actividad mutagénica. En estudios previos hemos identificado en el material particulado del aire de Santiago, la presencia de agentes mutagénicos indirectos los cuales son activados por enzimas del sistema de monooxigenases y de agentes mutagénicos directos que no requieren de activación metabólica. En este estudio utilizando el Test de Ames, se compara la actividad mutagénica de extractos orgánicos del material particulado del aire de Santiago, obtenidos en los meses de Marzo a Julio de 1990 y 1991, utilizando la cepa TA98 de Salmonella typhimurium. En 1991 hubo un notorio incremento en los indices pluviométricos, se implementaron medidas de restricción vehicular, se retiraron máquinas de la locomoción colectiva y se aumento el control a las emisiones industriales. No obstante, la razón de mutagenicidad (RM) (razón entre el número de revertantes inducidos por los extractos y el valor promedio de los correspondientes revertantes espontáneos) de las muestras obtenidas en 1991 fue considerablemente mayor que las analizadas en los mismos meses de 1990 en presencia de enzimas activantes. Un incremento aún mayor en la RM se observó cuando los ensayos fueron realizados en ausencia de enzimas activantes. Estos resultados indican que la mayor toxicidad de las muestras de 1991 se explica por un incremento tanto en los agentes genotóxicos directos como indirectos, lo que sugiere un aumento en el riesgo para la salud de la población a pesar de las medidas que han sido implementadas.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1314/91.

292

INDUCCION DIFERENCIAL DE MONOOXIGENASAS POR HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS (HAP) Y SUS DERIVADOS COMPONENTES DEL SMOG DE SANTIAGO. (Differential induction of monooxygenases by polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivates, from Santiago Smog). Quiñones, L. Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: I. Salazar).

Los HAP compuestos precarcinogénicos presentes en el material particulado del smog pueden reaccionar fotoquímicamente con óxido de nitrógeno, dando lugar a la formación de HAP nitrados, los cuales son mutágenos y carcinógenos directos, y a la vez potentes inductores de la isoenzima IA de citocromo P-450.
En este trabajo se realizó un estudio comparativo entre el efecto de un HAP y sus nitroderivados puros, y el efecto de extractos orgánicos del material particulado del aire de Santiago, sobre las actividades etoxiresorufina-O-desetilasa y acetanilida-hidroxilasa dependiente de las isoenzimas IA1 y IA2 de microsomas de hígado de ratas.
Se encontró que:
1. La actividad NADPH citocromo P-450 reductasa aumenta sólo en los animales tratados con HAP nitrados.
2. La actividad etoxiresorufina-O-desetilasa es notablemente aumentada por el tratamiento con HAP no nitrados, aumento mucho mayor al observado en animales tratados con nitroderivados. En cambio la actividad acetanilida-hidroxilasa aumenta mucho más por tratamiento con nitroderivados.
3. El tratamiento con extractos orgánicos de partículas del aire de Santiago, aumenta en igual proporción las actividades O-desetilasa e hidroxilasa.

Estos resultados sugieren, que los HAP y sus nitroderivados presentes en partículas del aire de Santiago, afectan las isoenzimas IA de citocromo P450. El incremento de la forma IA1 se debería a la acción de HAP; mientras que los nitroderivados serían responsables del incremento de la forma IA2.
El incremento de ambas isoenzimas, aumenta el número de estructuras químicas que pueden ser carcinogénicas, aumentando así el riesgo para la salud de la población.
Financiado por Proyecto FONDECYT 1314/91.

293

DETERMINACION POR HPLC DE HIDROCARBUROS POLICICLICOS AROMATICOS EN EL MATERIAL PARTICULADO DEL AIRE DE SANTIAGO Y SU RELACION CON EL POSIBLE RIESGO PARA LA SALUD HUMANA. (HPLC analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in Santiago airborne particles and their relationship with the human health risk). García, C. y Vásquez, H. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Evidencias epidemiológicas sugieren que el aire de ciudades con alto grado de contaminación puede ser uno de los factores responsables de canceres al tracto respiratorio. Ente los cientos de agentes químicos presentes en el aire contaminado urbano, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son los que presentan mayor riesgo para la salud humana. La principal fuente de emisión de estos compuestos son los vehículos motorizados, especialmente los que usan motores Diesel. Mediante HPLC se ha determinado la presencia de 14 HPAs en extractos orgánicos del material particulado del aire de Santiago. Entre estos se incluyen: indenopireno, dibenzoentraceno, benzo(a)pireno, benzo(k)fluoranteno, benzo(b) fluoranteno y benzoantraceno los cuales son considerados por la OMS como agentes cancerígenos. En los meses de Abril a Junio de 1991, el porcentaje de estos cancerígenos, respecto a la masa total de HPAs varió entre 29 y 70%. También se detectaron HPAs que no siendo considerados cancerígenos pueden reaccionar con otros contaminantes del aire para dar compuestos polares de alta actividad carcinogénica y mutagénica. Los niveles de HPAs en Santiago son muy altos comparados con los de estudios realizados en ciudades de Europa y Estados Unidos y fueron considerablemente elevados en el mes de Junio de 1991, a pesar de todas la medidas que se han tomado para reducir la contaminación del aire. Estos resultados sugieren que los HPAs que se respiran en Santiago constituyen un alto riesgo para la salud de la población, por cuanto está establecido que el daño en el material genético es mayor con el incremento en la concentración de agentes cancerígenos y con el aumento del tiempo de exposición.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1314/91.

294

EFECTO DE CONTAMINANTES DEL AIRE DE SANTIAGO, SOBRE ACTIVIDADES OXIDATIVAS Y SINTESIS DE DNA DE NUCLEOS DE HIGADO DE RATA. (Effect of air contaminants from Santiago, on oxidative activities and DNA synthesis of rat liver nuclei)
Irarrazabal, C. y Salazar I.
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las partículas del aire de Santiago, contienen hidrocarburos aromáticos policíclicos precarcinogénicos (HAP), y sus nitroderivados carcinogénicos, los cuales en mamífero, son metabolizados por monooxigenasas que requieren NADPH para su actividad, y se localizan en retículo endoplasmático y membrana nuclear. Gran parte de los metabolitos producidos se elimina de la célula, pero el resto, se une a ácidos necleicos y a proteína, iniciando el daño celular.

El tratamiento de animales con extracto orgánico de partículas del aire de Santiago, produjo un notable aumento en las actividades benzopireno-hidroxilasa y etoxiresorufina-O-desetilasa de núcleos de hígado; el cual fue mayor al observado para estas actividades en microsomas del mismo tejido.

Se encontró una gran inhibición de la síntesis de DNA, cuando se preincubaron núcleos control con extracto orgánico antes del ensayo de síntesis. Esta inhibición fué mayor cuando la preincubación se hizo en presencia de NADPH.

Sin embargo, en experimentos donde se agregó extracto orgánico directamente al ensayo de síntesis, no se observó diferencia significativa por efecto de NADPH.

Se discuten los resultados en base a la actividad de la NADPH-cit-P450 reductasa de núcleo, para HAP y sus nitroderivados, presentes en partículas del aire.

FINANCIADO POR FONDECYT. PROYECTO 1314.

295

EFECTO DE UN INHIBIDOR DE COLINESTERASA EN EL DESARROLLO DE LA EROSION DE MOLLEJA EN AVES*. (Effect of cholinesterase inhibitor in the development of gizzard erosion in broiler chicks). López, C., Neira, M., Gallardo, R., Guerrero, E. y Rutman, M. (Patrocinio: P. Hinrichsen). Unidad de Bioquímica. INUAL Nutrición y Biotecnología.

La alimentación de los pollos con ciertos tipos de harina de pescado nacionales lleva a la aparición de lesiones ulcerosas en sus mollejas, desconociéndose los agentes que la producen.
En el presente trabajo se estudió la participación de la acetilcolina en el desarrollo de la erosión de molleja, utilizando un inhibidor irreversible de la acetilcolinesterasa (Fentión). Se determinó el grado de erosión (score de molleja) producido al alimentar pollos de 60g por 1,2,4 y 7 días con una dieta experimental, que contenía harina de pescado atóxica, y cantidades crecientes de 0 a 100 ppm de este pesticida organofosforado.
Los resultados mostraron aumentos significativos, acumulativos y directamente proporcionales a la concentración de Fentión presente en la dieta en los score de erosión de molleja en el período estudiado ($p<0,05$). Paralelamente se observaron disminuciones en la actividad plasmática de colinesterasa ($p<0,05$).
Se concluye de estos resultados que la sobreestimulación parasimpática produce erosión de la molleja en pollos y se demuestra además la necesidad de evaluar los niveles de pesticidas organofosforados en las harinas de pescado destinadas para la alimentación de aves y peces.
Participan en este trabajo S. Lavandero y J.P. Hinrichsen.
*Lavandero et al, Poultry Sci. 70:1633, 1991