

# Conferencias

ANIMALES TRANSGENICOS : NUEVA HERRAMIENTA DE INVESTIGACION BIOLOGICA (Transgenic animals, a new tool for biological research). Esponda, P. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, 28006 Madrid, España.

En la última década los resultados obtenidos gracias a la obtención de animales transgénicos (AT) han causado indudablemente una revolución en muchas áreas de la biología y la medicina. La creación de este tipo de animales parece el método más sofisticado, no sólo para analizar diferentes aspectos de expresión génica, sino también como una posibilidad en futuras aplicaciones industriales y médicas. Las técnicas para obtener AT parecen estar ya relativamente estandarizadas, y comprenden la microinyección de contrucciones génicas (que lleven el transgen junto a un promotor) en el pronúcleo masculino del embrión, y luego, la posterior transferencia de este embrión a una madre receptora. Si bien por lo general existe integración del gen transferido, su grado de expresión suele ser muy variable. Este fenómeno parece ocurrir porque la integración del transgen ocurre totalmente al azar en el genoma receptor. Las aplicaciones de los AT parecen mucho mayores de lo que hace pocos años se imaginaba: así se han obtenido interesantes resultados sobre la función de diferentes genes (oncogenes, reguladores de la inmunidad, determinación sexual, etc.). Por otra parte, se intenta en la actualidad mediante los AR, obtener mejoras para la producción animal, e incluso se les menciona como una posibilidad en futuras terapias génicas.

ANIMAL MODELS OF HUMAN DISEASES. Two Multi-Author Projects, Reported by Westphal, H. LMGD/NICHD/NIH, Bethesda, MD, USA.

**In vivo activation of a dormant oncogene.** In an effort to generate a mouse model of cancer initiation, our laboratory has previously characterized the effects of oncogene expression in the developing eye lens of transgenic mice. Special focus has been on the state of differentiation of lens tissue that becomes target of oncogenic conversion by the large tumor antigen (TAG) of the SV 40 virus. Our observations led us to conclude that the oncogenesis is determined by the state of the tissue ontogeny attained at the time of oncogenic activation. The need arose for a genetic procedure that would permit initiation of TAG expression at closely spaced intervals during the process of normal lens differentiation. Toward that goal, my co-workers M.L. Lakso and K. Mulder initiated a collaboration with B. Sauer (E.I. du Pont de Nemours & Co, Wilmington, D.E.) aimed at activating a dormant TAG gene in the developing lens with the help of a bacterial DNA recombinase. We generated two transgenes targeted for lens specific expression. One encodes the recombinase CRE, the other SV40 TAG preceded by a regulatory sequence, termed STOP, that contains CRE recognition sites and prevents the abutting TAG gene from being expressed. When strains of either genotype are mated, double transgenics with eye tumors result, suggesting that CRE has activated TAG by removing STOP. The experiment will allow us to look at the interplay of lens differentiation and oncogenesis in unprecedented detail. In addition, the approach can be generalized to activate virtually any transgene in vivo at a set time and location.

**Mouse models of human Gaucher disease.** Gaucher disease is a very common lipid storage disorder that results from the inherited deficiency of glucocerebrosidase. M. Tremblay and S.F. Huang of our laboratory collaborate with E.I. Ginns, M.E. LaMarca, B.K. Subblefield, S. Whinfield, B. Zablocka, E.N. Sidransky and B.M. Martin (NIMH/NIH), and with R.C. Mulligan (Whitehead Institute, MIT) and V. Tybulewicz (National Institute for Medical Research, Mill Hill England) in an effort to generate mouse models for this disease. Specific point mutations occur frequently in the human gene and affect enzyme activity. Analogous point mutations created by PCR primer directed in vitro mutagenesis, as well as deletion, have been inserted by homologous recombination in the glucocerebrosidase gene on murine embryonic stem cells, using a selectable targeting plasmid. Chimeric male mice have been derived from C57B6 blastocysts injected with the mutated embryonic stem cells. We have recently obtained our first mice that carry a mutated glucocerebrosidase gene. Mice that mirror the human disease will be valuable for studying the cause of the disease symptoms and for developing targeted therapy.

## FUNCTIONAL IMPORTANCE OF NEUTROPHIL KALLIKREINS AND KININOGENS.

Bhoola, K.D.,

\*Figueroa, C.D., #Henderson, Lydia & +Müller-Esterl, W.

Departments of Pharmacology and Biochemistry, School of

Medical Sciences, University of Bristol, Bristol BS8 1TD,

\*Institute of Histology and Pathology, Austral University,

+Department of Pathobiochemistry, Institute of Physiological

Chemistry, University of Mainz, Germany

Evidence will be provided for the discovery of a tissue kallikrein in azurophilic granules and L-kininogen (LK), H-Kininogen (HK) and plasma kallikrein on the external surface of the neutrophil. These findings raise important questions with regard to the role of these neutral proteases and their substrates both in the normal migratory process of neutrophils and during inflammation. A novel hypothesis would be the circumscribed release of kinins on the surface of the neutrophil and in close proximity to the junctional site of endothelial cells, in order to facilitate movement of the neutrophil to the interstitial tissue space by opening up a corridor between endothelial cells. Such a physiological function of kinins clearly merits experimental study. Cytokines and complement fragments attract neutrophils by chemotaxis to sites of inflammation. In the early phase of this pathological process neutrophils first marginate, pass through endothelial cell junctions and then migrate to the inflammatory nidus, where degranulation, probably releases both the kallikreins and the pepstatin sensitive cathepsin D. Depending on the pH of the environment, the neutral kallikreins may release kinins from kininogens attached to receptors on the surface of the neutrophil and when acidic conditions occur Cathepsin D generates leukokinins.

EVOLUTION AND ORGANIZATION OF NEUROENDOCRINE SYSTEMS.

Oksche, A. Department of Anatomy and Cytobiology, Faculty of Medicine, Justus Leibig University of Giessen, 123 Aulweg, D-6300 Giessen, Germany.

Secretory neurons capable of elaboration of neuropeptides and biogenic amines are an integral component of the vertebrate brain. This apparatus is involved in neuroendocrine communication by means of paracrine, transmitter-like, modulatory and neurohormonal messages. As a whole, it serves the adaptation of the organism to the external environment and the internal milieu. The survival of the individual and the preservation of the species depend on the perfection of this complex. In phylogeny, the nervous systems of vertebrates. In lower invertebrates, the central nervous system is the sole agency of nervous and endocrine functions. Obviously, amino acids and short-chain neuropeptides were the first signal substances, only later followed by biogenic amines. Polarized neuronal units displaying both sensory and secretory features represent the prototypes of secretory neurons. In the vertebrates brain, a strikingly similar type of cell, the CSF-contacting neuron, can be observed. An increasing complexity is achieved by rearrangement of the individual neuroendocrine units and their circuitries. Such structural changes have apparently played a crucial role in the development of neuroendocrine communication. Highly specialized secretory structures, the pineal and the subcommissural organ (SCO), occur at the roof of the third ventricle. Contrary to the neuronlike or paraneuronal pinealocytes the secretory ependymal and hypothalamic cells of the SCO are of glial lineage. Peptidergic and aminergic elements are also present in peripheral autonomic ganglia and paraganglia. Together with the enteroendocrine cells they establish a diffuse neuroendocrine system completing the central neuroendocrine apparatus.

PLANT-HERBIVORE COEVOLUTION: A REAPPRAISAL FROM THE MARINE REALM AND ITS FOSSIL RECORD (Coevolución planta-herbívoro: una reevaluación basada en organismos marinos y su registro fósil). Steneck, R.S\*. Darling Marine Center, University of Maine, USA.

Stable coexistence and inter-dependencies between herbivores and their food plants are often interpreted as resulting from coevolution. An untested assumption is that such intimate associations reflect an "evolutionary arms-race" over geologic time. An examination of the fossil record of apparently "coevolved" species of marine limpets and their algal-hosts indicated these mutualistic associations evolved recently and the timing of specific adaptations and coadaptations does not support the arms race model. Alternatively, several recent ecological studies support the hypothesis that trophic specialization and stable coexistence will be most prevalent among herbivores that are small, have low metabolic demands, reduced mobility and are predator-susceptible. They will commonly be associated with algae that are relatively large, well defended, of poor food quality, and have great thallus longevity and regenerative ability. Among the pool of herbivores capable of stable coexistence, it is possible that unilateral adaptations to generalized antiherbivore defenses occasionally evolve and in rare instances species-specific algal coadaptations result in mutualisms. The significance of mutualisms may be interpreted as being "coevolved" when they may represent only an end point along adaptive continuum which has been channeled by phyletic constraints.

\*Profesor Visitante, Departamento de Ecología, Pont. Universidad Católica de Chile

THE MECHANISM OF PROGRAMMED CELL DEATH IN THE BLASTOCYST OF THE MOUSE. Pierce, G.B., Gramzinski, R. and Parchment, R. Department of Pathology, University of Colorado School of Medicine, Denver, U.S.A.

Programmed cell death occurs in the inner cell mass (ICM) of the late blastocyst coincident with the loss of trophectodermal potential of the ICM. The paucity of fluid and cells precludes direct analysis to determine the mechanism of cell death. Accordingly, we used three lines of embryonal carcinomas as models of ICM: ECa247 as pretrophectoderm, P19 as embryonic epithelium and the embryoid bodies of C44 to serve as a source of fluid corresponding to that of the late blastocyst. ECa247 cells were killed in blastocele fluid and in that of C44, but P19 cells were not. This suggested the possibility that normal pretrophectoderm might be killed by a toxin in blastocele fluid. Accordingly, the fluid of C44 was analyzed and found to contain H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (generated by the catabolism of polyamines by amine oxidases) in amounts toxic for ECa247 but not P19. If P19 cells were incubated in buthionine-SR-sulfoximine (reduces glutathione peroxidase), these cells became sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suggesting that development of glutathione protective mechanisms is a part of the developmental program which protects cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Confirmatory studies were then conducted on normal blastocele fluid and it too contained H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in amounts lethal for malignant pretrophectoderm while sparing P19 cells. The data are compatible with the concept that programmed cell death is mediated via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated by catabolism of polyamines.

## TALLER: "HACIA UNA INTEGRACION GENETICO-ECOLOGICA: METAPOBLACION"

*Coordinador: Dr. Roberto Murúa*

ECOLOGIA POBLACIONAL Y VARIABILIDAD GENETICA EN CRICETIDOS EN HABITATS DIFERENTES. (Population ecology and genetic variability in cricetid species inhabiting different habitat patches). R. Murúa. Instituto de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Un habitat fragmentado puede originarse por causas primarias como catástrofes naturales y secundarios derivados de la acción del hombre. El resultado produce sucesiones ecológicas en diferentes estados de desarrollo. En el Bosque Experimental San Martín se ha observado que las poblaciones de sigmoidontinos colonizan en diferente tiempo distintos tipos de habitats (bosque, pradera-matorral, pradera) determinando extinciones locales y recolonizaciones en patrones predecibles.

Este fenómeno dispersivo provoca la necesidad de un análisis con mayor extensión geográfica a fin de entender la dinámica poblacional de estas especies. Estudios ecológicos realizados en el área mostraron una dinámica y demografía similar tanto temporal como espacial en las especies *Abrothrix olivaceus* y *Oryzomys longicaudatus*. Sin embargo, estudios recientes sobre la variabilidad genética mostraron que *O. longicaudatus* no presenta diferencias en loci enzimáticos entre los demos que habitan el bosque y la pradera-matorral, ya que los valores de Fst y la prueba de homogeneidad de frecuencias alélicas no fueron significativas, lo que indicaría que corresponden a una misma población. *A. olivaceus* en cambio, mostró diferencias genéticas detectables entre ambos habitats.

Se discute el problema de la escala que se requiere para un estudio en las dos especies, la falta de concordancia entre la unidad demográfica y la unidad genética, y la implicancia en el estudio de poblaciones de mamíferos silvestres a un nivel metapoblacional.

DIFERENCIACION GENETICA Y PATRONES DE LA HISTORIA DE VIDA EN ARTEMIA. (Genetic differentiation and life history patterns in *Artemia*). Gajardo, G. Instituto Profesional de Osorno.

En este trabajo se discute, usando al crustáceo *Artemia* como organismo modelo, la importancia que tiene en la distribución de la variabilidad genética la estructura espacial (fragmentada) de las poblaciones y las consecuencias de esto en la expresión de patrones de la historia de vida.

*Artemia* es un ejemplo de organismo de amplia distribución geográfica, aunque restringido a lagos y lagunas hipersalinas con un rango particular de condiciones ecológicas. Sin embargo, dentro de este rango es un organismo exitoso que alcanza grandes tamaños poblacionales y tolera grandes variaciones ambientales. Estas condiciones, junto a complejos mecanismos de especiación, determinan que las especies del género exhiban una sorprendente diferenciación genética intraespecífica, que se refleja en una variedad de patrones de la historia de vida.

En general, las observaciones en *Artemia* permiten sugerir que el tipo de habitat, fluctuante o estable, se asocia a la expresión de modos de reproducción cualitativa y cuantitativamente diferentes, de manera que los individuos sometidos a repetidos episodios de colonización evolucionan hacia una combinación de madurez temprana, mayor esfuerzo reproductivo y a tiempos de vida más cortos que los individuos expuestos a situaciones de mayor estabilidad ambiental.

Se discute el impacto de la fragmentación del habitat en la diversidad genética y la importancia de la aproximación genético-ecológica para resolver problemas evolutivos.

(Financiado por el IFS, Suecia y FONDECYT 0234-91).

GENETICA Y ECOLOGIA DE ROEDORES SUBTERRANEOS *Ctenomys*. (Genetics and ecology of subterranean rodents, *Ctenomys*). Milton Gallardo. Instituto de Ecología y Evolución, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia.

La adaptación a la vida subterránea ha moldeado convergentemente la dinámica poblacional, la demografía y los patrones de diferenciación genética en diversos taxa. Estudios evolutivos realizados en 10 poblaciones correspondientes a cinco especies de roedores cavadores andinos (*Ctenomys*) muestran patrones de diferenciación genética exacerbados por rasgos conductuales (agresividad, vida solitaria) de los animales. La capacidad de soporte del ambiente y las estrategias k de los roedores permiten la formación de colonias relativamente pequeñas, poblacionalmente desestabilizadas por la promoción de un efecto de endogamia. Extrínsecamente, las discontinuidades propias de la fisiografía del habitat y la orogenésis de los Andes han incidido sinergísticamente en el rol que han jugado los factores estocásticos en el moldeamiento evolutivo de esos demos transientes. Así, la dinámica poblacional y la fragmentación del habitat propician colonizaciones y extinciones locales. Por ello, una aproximación metapoblacional que enfatice la fragmentación interdémica y el desequilibrio de las unidades de apareamiento aparece sugerente frente a las características del grupo en cuestión.

(Financiado por proyectos FNC 89/70 y DID, UACH S-91-11).

HACIA UN ESTUDIO DE LAS METAPOBLACIONES. (Toward to the understanding of metapopulations). Luz A. González. Instituto de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Por mucho tiempo, ha primado en la ecología un ilegítimo reduccionismo ontológico, una concepción determinista y un aislamiento intelectual, que han limitado el establecimiento de interacciones firmes con otras disciplinas. Sin embargo, la detección y análisis de patrones, el estudio de perturbaciones ecológicas y oportunismo, se enriquecen con el conocimiento acerca de la heterogeneidad genética. Factores estocásticos como el efecto fundador se han incorporado en modelos ecológicos recientes. Por otra parte, la teoría de la optimización aplicada a estrategias de historia de vida, reproductivas y de alimentación, se enriquece con el conocimiento de la herencia de los caracteres componentes de la adecuación biológica.

Este taller está focalizado a integrar aspectos de genética y ecología con una perspectiva metapoblacional, enfatizando el análisis de la estructura espacial de las poblaciones, importancia de las unidades de escala y niveles de organización biológica, implicancias de disturbios y fragmentación del habitat de las especies, y la relación entre variabilidad ecológica y genética.

Una metapoblación (Levins, 1969) corresponde a un conjunto de poblaciones interactuantes en tiempo de vida finito, cuya dinámica está ligada a los procesos de extinción y colonización. Las metapoblaciones han permanecido como un concepto pobremente desarrollado en la biología empírica, aunque se ha reconocido que modelos de poblaciones únicas son inadecuados para describir la dinámica de numerosas especies. Se discuten distintos modelos metapoblacionales.