FARMACOLOGIA E INMUNOLOGIA

197

ESTANDARIZACION DE UN CULTIVO DE HIBRIDOMA CB-HEP1 EN PERLAS DE ALGINATO DE CALCIO

(Culture standarization of Hybridoma CB-HEP1 in Calcium Alginate beads). Ramos,R., Aguillón,J.C., Horenstein,A., Merino,M., Salma, N., Pérez,M.E. y Ferreira,A.1Fac. de Cs.Ocas y Fceuticas y 2Fac. de Cs. Vet.y Pecuarias:Univ. de Chile. 3Centro de Ing. Genética y Biotecnologia.La Habana, Cuba.

CB-HEP1, hibridoma productor de anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-proteina S del virus de la Hepatitis B, fue cultivado in vitro mediante encapsulación en perlas de alginato de calcio. Las células, mantenidas 24 hrs en crecimiento exponencial en medio DMEM /10%ST/ 1%HEDS(MS) en spinner (Bellco) de 500 ml, fueron centrifugadas, resuspendidas en medio de lavado (ML:DMEM/pen-estrep.) y divididas en 2 suspensiones (A y B) de 1 x 10^6 cels/ml cada una. Ambas fracciones fueron mezcladas por separado con igual volumen de una solución de alginato de sodio al 1,6%, transferidas a jeringas de 50 ml y goteadas uniformemente sobre 150 ml de Cl_2Ca 50 mM y 100 mM, respectivamente, a temperatura ambiente. Las cápsulas fueron resuspendidas en 200 ml de MS y cultivadas a 37°C en frascos spinner de 250 ml. A partir del dia 2, se cambió el medio cada 24 hrs y en él se determinó consumo de glucosa (kit Sigma), concentración y especificidad de la Ig por ELISA, número de cels/ml de sobrenadante y viabilidad celular. Asimismo, cada 72 hrs, se determinó el número de cels/gr de perlas, mediante disolución en citrato de sodio 50 mM. En A se encontró una mayor densidad celular y producción de ig, aun cuando hubo un mayor escape de células al sobrenadante.

-Financiado por PNUD Proyecto DP/RLA/83/003.
-J.C.A. es becado de CONICYT.

198

INTERRELACION FISICA ENTRE CELULAS DE LANGERHANS Y LINFOCITOS T DURANTE LA PRESENTACION DEL ANTIGENO IN VITRO. (Physical interaction between Langerhans cells and T lymphocytes during antigen presentation in vitro). Vidal MA, Garcès G, Bustos T. Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile. (Patrocinio: M.Concha).

La interrelación física célula presentadora de antígenos-linfocitos T corresponde a una etapa temprana esencial de la respuesta inmune a antígenos timodependientes. Para estudiar las interacciones físicas antígeno-específicas producidas entre células de Langerhans (CL) y linfocitos T murinos singeneicos, se obtuvieron suspensiones de células epidérmicas enriquecidas en CL usando anticuerpos monoclonales anti-Ia y placas de poliestireno cubiertas con anti-IgG de ratón. La pureza de las CL recuperadas fué del 78% o más de acuerdo a la reacción de la ADPasa, inmunotinción para Ia y presencia del gránulo de Birbeck. La coincubación de CL previamente expuestas a hemocianina dinitrofenilada (LPH-DNP, 1 hr a 37°C) con linfocitos T sensibilizados in vivo, produjo la formación de un número significativo de conjugados celulares antígeno específicos. La microscopía electrónica (ME) de los conjugados reveló zonas de adhesión CL-linfocito con puentes intercelulares, uniones glicocálix-glicocálix y fusiones focalizadas entre las membranas plasmáticas de ambas células, y polarización de organelas de la CL hacia la zona de contacto. Coincidentemente, el antígeno fué demostrado con inmunocitoquímica a ME en la zona de contacto.

Estos resultados confirman observaciones efectuadas previamente por nuestro grupo respecto al desarrollo de estructuras de unión intercelular antígeno-específicas que ocurren en la interacción CL-linfocitos T en diferentes patologías humanas y experimentales.

Financiado por FONDECYT 89/198 y DIC UACH S-89-16

199

DEMOSTRACION DE UNA VIA INTRACELULAR DE PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS EN CELULAS DE LANGERHANS AISLADAS DE EPIDERMIS DE RATON. (An intracellular antigen-processing pathway in Langerhans cells isolated from murine epidermis). Concha M y Sánchez H. Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

Recientes evidencias indican que la célula de Langerhans (CL) posee la capacidad de procesar antígenos para su presentación al linfocito T. Para identificar los compartimientos subcelulares involucrados en el procesamiento, obtuvimos suspensiones de células epidérmicas de ratón enriquecidas en CL (70 - 84 % de pureza) utilizando incubación con anticuerpos monoclonales anti-Ia y placas de poliestireno cubiertas con anti-IgG de ratón. Exponiendo las células 1 hr (37°C) a hemocianina-oro (LPH-oro) y deteniendo la reacción con NaN_3 0.02 % , se comprobó a microscopía electrónica que LPH-oro se asociaba en las CL a la membrana plasmática, gránulos de Birbeck, vesículas cubiertas, endosomas y lisosomas. Reduciendo la exposición a 10 min, la mayor parte de la marca fué localizada en la membrana plasmática, gránulos de Birbeck y vesículas cubiertas. A las 3 hrs se encontraba en relación a la membrana plasmática, endosomas y lisosomas. Debido a que las CL previamente expuestas a LPH-oro (1hr) formaron conjugados celulares antígeno-específicos cocultivadas (1 hr 4°C) con linfocitos T singeneicos sensibilizados, concluimos que al menos parte del material marcado localizado en la superficie de las CL había sido procesado. Nuestros hallazgos sugieren que en la CL las organelas mencionadas forman parte de una vía específica de endocitosis, procesamiento y presentación de antígenos cuyas etapas pueden ser diferenciadas temporal y espacialmente.

Financiado por FONDECYT 89/0198 y DIC-UACH S-89-16

200

DISECCION DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*. (Disection of the immune response to *M. tuberculosis*). Carlos Moreno. MRC Tuberculosis and Related Infections Unit. Royal Postgraduate Medical School. Londres. Inglaterra.

Tres componentes de la respuesta inmune juegan un papel fundamental en la protección contra infecciones micobacterianas: inmunidad celular, inducción de citoquinas y activación de macrófagos. Recientemente, se ha reactivado el interés por la producción de anticuerpos.

Utilizando antígenos purificados y peptidos sintéticos correspondientes a las proteinas 19kDa y 38kDa de *M. tuberculosis*, ha sido posible delinear los epitopos más importantes en ratones y humanos, así como establecer sus propiedades mitogénicas e inmunoreguladoras. Fue posible establecer la importancia del amino terminal de éstas moléculas en lo que se refiere a inmunidad por células T ayudadoras ($CD4^+$) y se pudieron obtener peptidos de tamaño discreto (menos de 20 aminoácidos) que refuerzan dicha inmunidad. Por el contrario, no se observó respuesta citotóxica contra los mismos peptidos. La respuesta humoral no mostró la misma preponderancia hacia ese extremo de la molécula, aunque fue posible definir algunos epitopos lineales presentes en ambos extremos de las moléculas. El análisis de la respuesta contra la proteinas completas indicó la presencia de epitopos conformacionales y propiedades inmunoestimulantes que, en parte, pueden atribuirse a lipoilación de éstas proteínas.

Otros componentes micobacterianos que forman agregados con estas lipoproteinas, como es el caso de lipoarabinomananes y arabinogalactanes demostraron tener propiedades inmunoreguladoras, indujciendo la síntesis de citoquinas y modulando la función macrofágica.

201

INDUCCION DE INMUNIDAD CELULAR CONTRA BRUCELLA: ESTABLECIMIENTO DE LINEAS CELULARES T ESPECIFICAS. (Induction of cell mediated immunity against Brucella: develops of specific T cell lines). *Oñate, A., Zárate, A. Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. (Patrocinio H. Folch).

En el presente trabajo se evaluó la respuesta inmune inducida por proteína extraída de B. abortus RB-51. Este antígeno fue utilizado para inmunizar intraperitonealmente diferentes grupos de ratones RK, analizando posteriormente sus niveles de Ac. y su reacción de hipersensibilidad. Paralelamente y de acuerdo a resultados anteriores, se purificó la proteína 40 de RB-51, a partir de geles preparativos para luego inmunizar ratones RK, con el fin de obtener Ac. policlonales y líneas de células T con especificidad anti proteína de Brucella.

Los resultados demuestran que la proteína de RB-51 no induce Ac., sin embargo induce una hipersensibilidad con moderado infiltrado mononuclear de ubicación perivascular y una reacción mixta de PMN e Histiocitos. El suero preparado contra la proteína 40 reconoce la proteína denaturada probada mediante Western Blot, pero no es inmunoadsorbido con proteína nativa. Sin embargo, la línea de células T específicas para la proteína 40, son capaces de proliferar en presencia de proteína 40 purificada y proteína total de RB-51 nativa.

Estos resultados demuestran las bondades de la proteína RB-51 como inductor de inmunidad celular y su poca antigenicidad para evocar la respuesta inmune humoral, que en este caso es indeseable por entorpecer el diagnóstico.

(Financiado por United Nations University 00-91).
* Becario CONICYT.

202

FACTOR SUPRESOR DE IgE: CARACTERIZACION E IMPLICACIONES CLINICAS. (IgE suppressor factor: characterization and clinical implications). Astorquiza, M.I., Valdés, M., Calvo, M.*, Droguett, M.A. Instituto de Inmunología, Instituto de Pediatría *, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

Previamente hemos demostrado un factor capaz de inhibir la reacción de anafilaxis cutánea pasiva (PCA), presente en suero de ratón. En el presente trabajo se analizan las características, rol biológico y proyección clínica de un factor similar presente en suero humano.

El factor se encuentra en el 30% de la población analizada. Es posible obtenerlo a partir de un "pool" de suero humano. Las propiedades determinadas previamente permiten su purificación: Precipita entre 33-40% de sulfato de amonio; tiene PM 67 K, determinado por filtración en gel y SDS-PAGE; posee manosa, determinada por afinidad a lectinas, la cual es necesaria para su actividad inhibitoria y presenta afinidad a IgE. Es posible separarlo eluyendo el complejo IgE - factor desde nitrocelulosa seguida de SDS-PAGE.

La evaluación clínica del factor en pacientes pediátricos indica una relación inversa estadísticamente significativa entre presencia de factor y expresión del cuadro alérgico. Considerando su implicancia clínica, se discute un modelo de inducción de anticuerpos que permita su cuantificación "in vitro" y el análisis de su mecanismo regulatorio.

Financiado por Proyectos FONDECYT 91-0952 y DID-UACH S-90-17.

203

ESTABLECIMIENTO DE UNA LINEA CELULAR HIBRIDA RATON-BOVINO PARA SER USADA COMO LINEA PARENTAL EN LA PRODUCCION DE HIBRIDOMAS BOVINOS. (Establishment of a bovine-murine heterohybrid cell line and its possible use as parental cell line for production of bovine monoclonals antibodies). Eller, G. y Folch, H. Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

En el presente trabajo se reporta la obtención y características de una línea celular heterohíbrida, no secretora, 8 azaguanina resistente y su uso como línea parental para la obtención de anticuerpos monoclonales bovinos.

El clon heterohíbrido obtenido en el laboratorio por fusión de células murinas NSO/2 y células macrofágicas de bovino fue cultivado en presencia de 8-azaguanina en dosis creciente de 2.5, 5 y 10 ug/ml. Este clon designado como MB2-R fue mantenido en cultivo por 12 meses. Las células mantienen su condición de células peroxidasa (+) y expresan en su superficie antígenos de bovino y de ratón.

La fusión celular se realizó mediante la técnica de Kohler y Milstein utilizando leucocitos de sangre periférica de bovinos vacunados con Brucella abortus cepa 19 y la línea parental MB2-R. Utilizando la técnica de ELISA se detectaron 5 clones secretores anti Brucella los que fueron reclonados por dilución límite y finalmente se expandieron 18 clones.

Estos resultados abren la posibilidad de identificar y analizar en detalle los epítopes importantes para el bovino, que en el caso de las moléculas proteicas de Brucella parecen ser totalmente diferentes a los determinantes antigénicos contra los que responde el ratón.

(Financiado por Proyecto IFS B/947-2 y Proyecto 89-21 DID-UACH).

204

IDENTIFICACION INMUNOMAGNETICA DE ANTIGENOS LIGADOS A H-2 EN ERITROCITOS Y SUBPOBLACIONES CELULARES DE RATON. (Immunomagnetic identification of H-2-linked antigens in mouse erythrocytes and cell subpopulations). Ramos, A., Fernández, J., Ojeda, J. y Hoecker, G. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

En publicaciones anteriores describimos dos antígenos, α y δ, presentes en el suero normal, glóbulos rojos (GR) y tejidos, determinados por genes ligados al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) H-2, del ratón que presentan diferencias significativas con los antígenos clásicos de trasplante. Aquí describimos la aplicación de una técnica rápida de identificación específica y separación de células portadoras de antígenos definidos, basada en el empleo de microesferas superparamagnéticas (γ Fe_2O_3) cubiertas con poliestireno que permite recubrirlas covalentemente con anticuerpos o cualquier molécula de interés, en nuestro caso, con anticuerpos de oveja anti-IgG de ratón, purificados por afinidad. Estos actúan como anticuerpo secundario permitiendo el acoplamiento de cualquier anticuerpo primario de ratón, que en los experimentos que se presentan fueron H-2.4,8,11,13 y anti-H-2.α, δ.

El objetivo de estos experimentos fué determinar si en las diferentes subpoblaciones celulares y en los eritrocitos, los antígenos de clase I y los nuevos antígenos α, δ, están ubicados en una misma molécula o si son independientes. Experimentos de bloqueo recíproco con anticuerpos anti-H-2 clase I y H-2α, δ indican que se trata de antígenos topográficamente separados determinados por genes independientes pero estrechamente ligados.

Parcialmente financiado por Proyectos:
DTI B2688-9044 y FONDECYT 89/0782.

205

INFECTIVIDAD DE CELULAS DE CULTIVO VERO POR TRYPANOSOMA CRUZI. EFECTO DE SUEROS INMUNES. (Infectivity of Trypanosoma cruzi trypomastigotes on culture VERO cells: Effects of immune sera).

Sánchez, G., Wallace, A., Correa, I. Departamento de Bioquímica y Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: A. Solari.)

Se estudió la capacidad de asociación (adherencia y penetración) de tripomastigotes de T. cruzi en celulas de cultivo VERO, los que fueron previamente opsonizados con sueros inmunes de ratones infectados con 6 cepas diferentes de parásitos. Los sueros fueron obtenidos a los 60 dias post infección de ratones que presentaron parasitemias patentes.

Las 3 poblaciones de parásitos utilizadas: clon Dm 28c y cepas Daza y Tulahuén infectaron ampliamente los cultivos celulares. Se observaron diferencias en los porcentajes de infectividad al pre tratar estas cepas con los diferentes antisueros. Todos estos antisueros en contra de clon Dm 28c, Daza, Tulahuén, RMS, V-115 y Sp161 presentaron anticuerpos específicos anti T. cruzi cuando se utilizó la forma epimastigote fijada, sin embargo no todos ellos se unieron a tripomastigotes vivos, al ser analizados por la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Este resultado se correlaciona con la capacidad lítica de los sueros, previamente establecida en trabajos anteriormente presentados.

Financiado por: Fondecyt, UNDP/World Bank/WHO. TDR.

206

ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES ANTI FACTOR VON WILLEBRAND. (Polyclonal and monoclonal antibodies to von Willebrand factor).

Villegas, J.V., Artigas, C.G. Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera. (Patrocinio: R. Sánchez).

El factor von Willebrand (FvW), es una glicoproteína de alto peso molecular integrante del mecanismo de la hemostasia. La evaluación del FvW se realiza habitualmente por técnicas basadas en el uso de anticuerpos anti FvW.

En este trabajo se muestra la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales anti FvW. Para ello se purificó FvW a partir de plasma humano y se inmunizó un conejo y ratones Rockefeller. La producción de anticuerpos en los animales se evaluó por inmunoelectroforesis en rocket.

El suero obtenido del conejo fue probado en paralelo con un anticuerpo comercial anti FvW, usando la técnica de inmunoelectroforesis en rocket para la medición del FvW en 45 individuos. Los resultados obtenidos con ambos reactivos fueron comparados, encontrándose una concordancia = 0.93 (Coeficiente de correlación intraclase).

Además, mediante el protocolo de Köhler y Milstein se realizó una fusión celular. Se obtuvieron 11 hibridomas secretores de anticuerpos anti FvW, 5 de estos anticuerpos inhibieron parcialmente el ensayo de agregación plaquetaria en presencia de ristocetina.

Financiado por DID-UFRO 8941-I y TWAS 890-106.

207

MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA INMUNIDAD EN FIEBRE TIFOIDEA. (Experimental models for the study of thyphoid fever immunity).

Sein, J., Cachicas, V., Bravo, L. y A.E. De Ioannes. Unidad de Inmunología, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La fiebre tifoídea es una enfermedad humana grave causada por *S. typhi*, el hecho que esta bacteria sea patogénica solamente en humanos y chimpancés, ha limitado los estudios de los mecanismos inmunitarios involucrados en la defensa a la fiebre tifoídea y el desarrollo de una vacuna efectiva.

Los ratones sufren un cuadro infeccioso similar al de la fiebre tifoidea, causado por *S. typhimurium*, una bacteria que afecta humanos sin generar un cuadro equivalente a la fiebre tifoídea, sin embargo se ha descrito que la inyección intraperitoneal de *S. typhi* en mucina de cerdo, hace a los ratones suceptibles a esta bacteria. Aunque este modelo ha sido usado como referencia por la OMS para la evaluación de vacunas con uso potencial en humanos, no existen evidencias claras que demuestren que las bacterias efectivamente se replican en los macrófagos peritoneales del ratón, requisito indispensable para evaluar la participación de la inmunidad celular en la respuesta contra *S. typhi* e identificar antígenos protectivos.

De acuerdo a experimentos realizados en nuestro laboratorio, el modelo ratón-mucina para la fiebre tifoídea tiene una dosis letal de 10^5 bacterias incorporadas a mucina por vía intraperitoneal. El tiempo de sobrevida con la dosis letal es de aproximadamente 24 hrs. El efecto potenciador de la virulencia por mucina dura no más de 6 hrs. La mucina promueve la adherencia a las células peritoneales y aumenta la sobrevida intracelular de las bacterias.

Debido a las características de este modelo, es difícil evaluar el papel de la respuesta celular en la fiebre tifoídea experimental, porque la muerte de los animales ocurre antes de la aparición de las primeras manifestaciones de la respuesta mediada por células, que se supone determinante en el control de una infección causada por una bacteria de crecimiento intracelular por el sistema inmune. Se discutirá el mecanismo por el cual la mucina aumenta la virulencia y sobrevida de *S. typhi* en el ratón y las estrategias a seguir para lograr una sobrevida mayor de los ratones.

Financiado por Proyecto FONDECYT # 91-0684
El Sr. León Bravo R. es becario de la Fundación Andes.

208

PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LAS HORMONAS TIROIDEAS T3 Y T4 (Production and characterization of monoclonal antibodies against T3 and T4 thyroid hormones).

Aguayo, J., Jamett, A., Juica, F., Foradori, A., Becker, M.I., Unidad de Inmunología, Bios Chile IGSA y Laboratorio de Medicina Nuclear, Centro de Diagnóstico, Pontificia Universidad Católica.

La determinación de las hormonas tiroídeas triiodotironina (T3) y tiroxina (T4) tiene gran importancia en clínica, para diagnosticar numerosas enfermedades asociadas a trastornos del metabolismo basal. La falta de un diagnóstico oportuno del nivel de estas hormonas, afecta tanto el desarrollo como la conducta del ser humano. En Chile, la determinación de T3 y T4 se realiza exclusivamente por radioinmunoensayo (RIA) con reactivos importados, por esta razón, se ha considerado importante producir mediante un proceso biotecnológico como es la tecnología de hibridomas, los anticuerpos monoclonales (AMC) necesarios para medir T3 y T4. Posteriormente, se pretende reemplazar el RIA convencional por un ELISA no convencional, basado en el principio de las reacciones entre un idiotipo (anticuerpo de captura) y un anti-idiotipo (anticuerpo indicador).

Se inmunizaron ratones de la cepa Balb/c con T3 o con T4 acoplado a proteínas transportadoras. El desarrollo de la respuesta humoral se determinó por ELISA y los hibridomas se produjeron mediante el procedimiento habitual, utilizando la línea mieloide NSO/2. Los AMC contra T3 ó T4 se seleccionaron por ELISA y posteriormente se estudió en un sistema en fase líquida, la capacidad de unión de los anticuerpos a T3-^{125}I y a T4-^{125}I.

Los resultados obtenidos muestran que se ha desarrollado una metodología adecuada para producir, seleccionar y caracterizar monoclonales contra T3 y T4 y además, han permitido iniciar los protocolos para producir anticuerpos anti-idiotípicos.

FINANCIAMIENTO: Proyecto Corfo.

209

EFECTO DE ETANOL SOBRE RECEPTORES $GABA_A$ EN NEURONAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATON.

(Effects of Ethanol on $GABA_A$ Receptors in Neurons of the Mouse Central Nervous System). Aguayo, L.B., Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso. (Patrocinio: S. Marshall G.).

El ácido Gamma Aminobutírico (GABA) es un importante neurotransmisor inhibitorio encontrado a través del sistema nervioso central. Activación de una clase de receptores postsinapticos ($GABA_A$) por GABA produce una corriente de Cl^- rápida que lleva a una hiperpolarización o depolarización de la membrana celular. El aumento en la conductancia al Cl^- asociada a la activación de receptores $GABA_A$ está sujeta a la influencia farmacológica de barbitúricos y benzodiazepinas que pueden aumentar la conductancia al Cl^- actuando en lugares distintos en el receptor $GABA_A$.

Usando técnicas de patch clamp hemos encontrado que el etanol a concentraciones entre 1 y 40 mM aumenta la amplitud (50-200% de control) de la corriente de Cl^- activada por GABA en neuronas cultivadas de la corteza cerebral y del hipocampo del ratón (C57BL6J).

Mostrando un grado de especificidad, el etanol no potenció todas las neuronas estudiadas (50%). Neuronas que fueron resistentes al etanol fueron potenciadas por barbitúricos (1-50 M). El efecto del etanol en la corriente de Cl^- activada por GABA fue completamente reversible cuando la solución que contenía el etanol fue retirada de las cercanías de la neurona en estudio.

Estos resultados demuestran que concentraciones farmacológicas de etanol potencian el efecto de GABA en neuronas del sistema nercioso central. Esto sugiere que este efecto celular podría estar relacionado con la acción inhibitoria del etanol en el cerebro. Finalmente, el sitio donde el etanol actúa en los receptores $GABA_A$ es diferente a aquellos de los barbitúricos y benzodiazepinas.

210

EFECTO DE LOS ANALOGOS DE ADENOSINA, L-PIA Y NECA, SOBRE LA DEPENDENCIA FISICA DE BARBITAL (Effects of the adenosine analogs, L-PIA and NECA, on physical dependence on barbital) Germany, A. Departamento de Farmacología, Universidad de Concepción.

Tanto la adenosina como sus análogos estructurales producen notables efectos en el SNC, habiéndose demostrado que inhiben el desarrollo de dependencia a diversos depresores.En este trabajo se estudia la acción de la 1-fenilisopropil adenosina (L-PIA) y de N-etilcarboxamida adenosina (NECA)en ratones,administrándolas tanto durante el desarrollo de la dependencia de barbital como durante el período de supresión de su administración crónica.

Se emplearon ratones a los que se les administró barbital en la comida durante 8 días.En los grupos en que se administraron los derivados de adenosina durante el desarrollo de dependencia, ellos fueron inyectados a partir del quinto día de tratamiento,en tanto que en los grupos ya hechos dependientes su administración se efectuó durante el perído de la supresión (48 horas).

Los resultados demostraron que tanto la L-PIA como la NECA atenúan la intensidad del sindrome de abstinencia inducido por la ingesta crónica de barbital, pero ninguno de los dos análogos modificó el desarrollo de dependencia cuando se administraron durante el período de inducción del proceso.

Se postula que la acción de adenosina sobre el sindrome de privación de barbital,estudiada a través de administración de sus agonistas L-PIA y NECA podría ejercerse a través de la disminución del flujo de calcio, reduciendo la liberación de neurotransmisores, afectando en consecuencia la intensidad del sindrome.

Proyectos 20.33.52. Dirección de Investigación, Universidad de Concepción y FONDECYT 0699-89.

211

EFECTO DEPRESOR DE TAURINA EN LOS POTENCIALES EVOCADOS CORTICALES VISUALES DE LA RATA.(Depressor effect of taurine on visual cortical evoked potentials of the rat). Cañas, P.E. Area de Ciencias Biológicas, INTA. Universidad de Chile. Casilla 138-11. Santiago. Chile.

Taurina, un aminoácido muy abundante en las vías visuales, ejerce una acción inhibitoria en neuronas centrales. Se ha descrito que este efecto inhibitorio es probablemente mediado vía receptores glicinérgicos, $GABA_A$ y/o $GABA_B$. En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración tópica cortical de taurina en los potenciales corticales visuales evocados en ratas adultas y la susceptibilidad de este efecto a bicuculina y estricnina. Se utilizaron ratas anestesiadas con -cloralosa, curarizadas y bajo respiración artificial. Las respuestas visuales se evocaron con flash binoculares de luz blanca y las drogas (taurina: 0,15, 0.25 y 0.50 umol; bicuculina: 1,35 nmol; estricnina: 1.50 nmol) se aplicaron sobre la corteza visual primaria mediante un papel filtro de 1.5 x 1,5 mm. Los resultados mostraron que taurina induce una reducción dosis-dependiente de los potenciales evocados visuales (I D50: 0.28 umol) efecto que no fue antagonizado por bicuculina ni por estricnina.

Se concluye que taurina deprime la actividad evocada en neuronas de la corteza visual, a través de un mecanismo que no involucre receptores glicinérgicos o $GABA_A$.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt # 91-1297.

212

BOLDINA, UN POTENTE INHIBIDOR DE LA LIPOPEROXIDACION: MECANISMOS DE ACCION (Boldine, a potent inhibitor of lipid peroxidation: Mechanisms of action) Speisky, H; Kukielka, E; Cederbaum, A. Unidad de Bioquímica Farmacológica, INTA, Universidad de Chile; Dept. Biochemistry, Mount Sinai School of Medicine, CUNY, New York. (Patrocinio: A. Valenzuela).

Como resultado de investigaciones destinadas a explorar el potencial farmacológico de la boldina (B), presente en abundancia en las hojas del boldo (*Peumus Boldus* Mol.), nuestro grupo recientemente estableció que este alcaloide se comporta como un potente inhibidor de procesos radicalarios oxidativos en sistemas biológicos y abióticos. Con el objeto de investigar el mecanismo que subyace a la actividad antioxidante de la B, evaluamos su posible interacción con diversos sistemas modelo generadores de radicales libres. La adición de B a membranas microsomales bloqueó totalmente (Ki 10uM) la lipoperoxidación (LP) enzimática (en presencia de NADPH o NADH) iniciada por Fe-EDTA o por CCL4. Boldina fué igualmente efectiva (Ki 15uM) en prevenir la LP no-enzimática inducida FeCL2 o por ter-butil hidroperóxido. B no afecto las actividades MEOS, N-demetilasa, ni la producción microsomal de H2O2, revelando así, la ausencia de interacción con el citocromo P-450 o con la reductasa respectiva. La adición de B a un sistema xantina oxidasa no inhibió la producción de radicales superóxido, como tampoco interactuó con radicales hidroxilos generados por microsomas incubados en presencia de sustratos atrapadores de este radical. Se concluye que la boldina no interactua en forma directa con oxiradicales iniciadores de la LP ni con los sistemas enzimáticos generadores de estos. Se postula que la actividad antioxidante de la boldina resulta de su interacción con radicales tipo sustrato-lipídicos, previniendo asi la LP en su fase de propagación.

Financiado por FONDECYT 1047-91 y FDP, CORFO.

213

INHIBICION DE TRANSPORTE DE SODIO Y ATPasa POR PENTACLOROFENOL (Inhibition of the sodium transport and ATPase by pentachlorophenol (PCP)

Quevedo L.
Departamento de Fisiología. Universidad de Concepción.

Los efectos del pentaclorofenol (PCP) se estudiaron en una preparación "in vitro" de un epitelio transportador de iones. La técnica clásica de estabilización de voltaje de Ussing's en epitelio de batracio se uso en la piel de abdomen de Pleurodema thaul. Se añadieron al baño mucosal y/o serosal dosis crecientes de PCP entre 0.003-0.043 mM, lo que produjo una inhibición irreversible en la corriente de corto circuito y en la diferencia de potencial. Además utilizando el test de amilorida de Isaacson's se calculó los cambios de conductancia transepitelial. El consumo de O_2 medido por método polarográfico por acción del PCP aumentó. La actividad de ATPasa se determinó "in vitro", a partir de un medio que contenía ATP en presencia de concentraciones crecientes de PCP. La acción inhibitoria sobre el transporte activo de sodio en términos del circuito eléctrico equivalente y el aumento del consumo de O_2 podría explicarse por una acción desacoplante de la fosforilación oxidativa del PCP y la acción de dosis altas de PCP por inhibición de ATPasa.

Financiado por Proy. DI. 20.33.41 de la Universidad de Concepción. y Proy. DI 20.33.43.

214

AFLATOXINAS Y MERCURIO:EFECTOS INDUCIDOS POR ADMINISTRACION CRONICA EN GALLINAS (Aflatoxins and mercury: effects induced by cronic administration in hens).

Paz de la Vega, Y., Departamento de Ciencias Clínicas (Farmacologia) Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Las aflatoxinas, especialmente aflatoxina (AF B_1) y mercurio constituyen agentes contaminanantes potencialmente presentes en las dietas de aves. Estas sustancias, en relación a sus concentraciones y período de consumo, pueden afectar con diversa intensidad aspectos productivos y reproductivos de las especies afectadas.

Se escogió como material biológico, gallinas White Leghorn en su primer período de postura, que fueron sometidas a dos tipos de tratamientos: Tratamiento 1. Constituido por 100 aves distribuidas aleatoriamente en 4 grupos experimentales que consumieron 0,0; 25; 50 y 100 ppm de cloruro de mercurio ($Hg\ Cl_2$) durante 16 semanas. Tratamiento 2. 36 gallinas fueron alimentadas durante 28 días con dietas conteniendo 0,0; 400 y 800 ppb de AF B_1. Se analizaron diversas variables productivas y reproductivas.

Los resultados indican que la AF B_1 afecta el peso corporal, consumo de alimento, producción, peso del huevo y mortalidad embrionaria. La presencia de mercurio (100 ppm) influye sobre el peso, consumo de alimento y deterioro en la producción de huevos. Alteraciones embrionarias se presentaron en todas las concentraciones ensayadas.

215

ACTIVIDAD BIOLOGICA DE PLANTAS MEDICINALES MAPUCHES: EFECTO HIPOTENSOR, TOXICIDAD E INHIBICION DE LAS ENZIMAS XANTINA OXIDASA Y β-GLUCURONIDASA.(Biological activity of Mapuche medicinal plants: hypotensive effect, toxicity and inhibition of the enzymes xanthine oxidasa and β-glucuronidase)

Schmeda-Hirschmann, G., Loyola, J. I., Sierra, J., Retamal, R. y Rodriguez, J. A. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca (Chile).

La etnia Mapuche es el grupo Amerindio numéricamente más importante de Chile. Su medicina tradicional se basó en preparados vegetales, cirugía menor y magia. Para validar la información etnobotánica, se seleccionaron 30 plantas cuyo empleo sugería un posible efecto hipotensor, protector hepático o antigotoso.

Los extractos crudos EtOH:H2O 7:3 se evaluaron "in vitro" mediante ensayos de inhibición enzimática. La enzima xantina oxidasa (XO) cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y finalmente ácido úrico, el exceso del cual desencadena la sintomatología de la gota en humanos. La β-glucuronidasa (β-gluc) hidroliza β-D-glucurónidos a un alcohol y D-glucuronato. Se ha informado que puede deconjugar bilirrubina a nivel biliar, favoreciendo la formación de cálculos vesiculares. El efecto hipotensor se determinó empleando ratas macho Sprague-Dawley normotensas. Los extractos se administraron en forma intravenosa (5 mg/Kg peso) en un volumen de 0.1 ml. La toxicidad de los extractos se evaluó mediante el ensayo del camarón Artemia salina.

El 80% de los extractos inhibieron significativamente a la β-glucuronidasa, con IC 50 10 ug/ml. Sin embargo, no se observó una buena actividad sobre la XO. Se demostró un claro efecto hipotensor en 10 de las plantas ensayadas, con caídas en la presión 20%. Los tiempos de recuperación variaron entre 0.3 y 9.2 minutos para las especies activas. En este grupo, se observó una buena correlación con los antecedentes etnobotánicos, ya que de las 15 especies con efecto supuesto, 8 resultaron activas. La toxicidad de las muestras sobre la Artemia salina (LC 50, ug/ml) varió entre 7 y 2300 ug/ml. No se observó correlación entre la toxicidad, el efecto hipotensor y la inhibición de las enzimas XO y β-gluc.

(Apoyado por los proyectos FONDECYT 039/90 e IFS 1720/1)

216

FACTOR DE RELAJACION VASCULAR LIBERADO POR LA AURICULA AISLADA DE RATA EN LA SOLUCION DE PERFUSADO. (Vascular relaxing factor liberated by the rat isolated atria in the perfusate solution).

*Illanes,A.; Penna,M. y Martínez, J.L. Depto. Farmacología, Fac.Medicina, Univ.de Chile y *Depto.Ciencias Fisiológicas, Esc.Medicina,Univ. de Oriente, Venezuela.

Ha sido demostrada una hormona de naturaleza peptídica que es sintetizada y depositada en gránulos del miocardio auricular, la cual cumple un papel regulatorio en el balance de agua y sodio a nivel del riñón, controlando además el tono vascular y cuya liberación se efectuaría cuando se distiende la pared auricular. Con el propósito de iniciar el estudio de estos mecanismos, se extrajeron de ratas Wistar adultas privadas de agua y alimento durante 48 hrs, las aurículas para ser montadas en un baño de órgano aislado que contenía 5 ml de solución Krebs Henseleit modificado (K-H) a 31°C y a las cuales se les registró la actividad contráctil espontánea mediante un transductor Grass FT03C conectado a un fisiógrafo de igual marca. Una vez estabilizada la preparación con una tensión basal de 0.5 g, se procedió a aplicarle tensiones bruscas controladas, con cargas que iban progresiva y aditivamente de 0.5 a 3.0 g en total con el transductor previamente calibrado y montado sobre el tornillo sin fin de una base Palmer. Dentro del minuto siguiente a la sobrecarga mayor se extrajo el líquido del baño, se acidificó a pH aprox.5, con una sol.de Ac.Acético 1 M y se guardó en el congelador a -12°C. La muestra así obtenida (M6) fue ensayada al día siguiente en anillos de aorta aislada de rata. Mantenidos estos en solución K-H a 37°C y previamente contraídos por una concentración de efecto sub-máximo de fenilefrina ($5x10^{-7}$M). En estas condiciones la M6 relaja lentamente (aprox.5 min) esta preparación. Igual efecto ejercen,aunque en menor magnitud,las muestras similares,no acidificadas y guardadas en frío. Tanto la solución K-H sola,como aquella en que se realiza la disección auricular, carecen de capacidad relajadora de los anillos de aorta de rata. (Proyecto año sabático de A.Illanes).