93

ACTIVIDAD DE LA BOMBA DE SODIO EN CELULAS SIMETRICAS DE RATAS UREMICAS. (Na-pump activity in non epithelial cells of uremic rats).

Bofill, P. y Marusic, E.T. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

La uremia se caracteriza desde el punto de vista de la homeostasis de potasio por una adaptación del tejido renal remanente y del tejido colónico los que aumentan la secreción de K. Por el contrario, en nuestro laboratorio se ha descrito un manejo deficitario de K en el músculo esquelético de ratas con insuficiencia renal crónica. Dado que no solo el músculo sino que también el tejido adiposo participa en la homeostasis interna de potasio se decidió estudiar su rol en el transporte de K desde los espacios extracelulares.

Se utilizaron dos grupos de ratas machos: controles y con nefrectomía 5/6. El grado de insuficiencia renal se evaló por la medición de creatinina plasmática (controles=0,44mg/dl; urémicas=1,82mg/dl). Se aislaron células adiposas del tejido periepididimario y se midió la actividad de la Na, K-ATPasa mediante la captación de Rb^{86}.

Los resultados demuestran una significativa disminución de la actividad de la bomba en adipocitos de ratas urémicas (control 7,43±0,84 nmolesK/3 x 10^5 cél/min y urémicas 4,75 ± 0,54 nmolesK/3 x 10^5 cél/min; $p < 0,01$). Esta reducción de la actividad de la Na, K-ATPase concuerda con lo recientemente descrito en nuestro laboratorio en músculo esquelético urémico. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el sóleo en el que solamente disminuye la isoforma $\alpha 1$, en el adipocito ocurriría una reducción de ambas isoformas. En efecto, al medir la isoforma $\alpha 2$, que es inhibida por 10^{-5} M ouabaina, se encontró que la proporción de ambas isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ eran idénticas en el tejido urémico en relación a los adipocitos controles.

Estos resultados apuntan a la existencia de diferentes mecanismos de regulación de la expresión de las isoformas α de la Na, K-ATPase en la uremia, con una consecuente actividad tejido-específica en dicha patología.

(Financiado por Proyecto Fondecyt 1295/91)

94

TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE AMINOACIDOS EN ESTOMAGO DE MAMIFEROS: CINETICA DE LA CAPTACION DE L-LISINA EN GLANDULAS OXINTICAS AISLADAS. (Transepithelial amino acid transport in mammalian stomach: kinetics of L-lysine uptake in isolated oxyntic glands).

Barahona,C.; Schulz,C.; Sobrevía,L.; Medina,V. y Bravo,I. Dpto.Fisiología, Fac.Cs.Biol.y de Rec.Nat., Universidad de Concepción.

Se demostró que la captación celular de L-aminoácidos (aa) en el epitelio gástrico, es mediada por sistemas comunes a otras células eucarióticas. Parte del aa captado desde el lumen por las células superficiales es absorbido, mientras que la captación que ocurre a través de la superficie basolateral no va seguida de secreción. Hasta ahora se ha detectado la presencia de los sistemas A y L en la mb. basolateral y el X_{AG} en la superficie luminal. En este trabajo se estudió la cinética del transporte de L-lisina a través de la superficie basolateral de glándulas oxínticas aisladas, como parte de la caracterización del o los sistemas encargados de la captación de aa básicos.

Siguiendo la técnica de Berlingh y Obrink glándulas del estómago de conejo, fueron aisladas e incubadas con lisina-H^3 (20 ó 30 s) para medir la captación de éste, tanto en ausencia como presencia del aminoácido no marcado. En un rango de 0.2 a 5 mM, el transporte de L-lisina fue saturable con una Kt = 7.2 mM, valor similar al de alanina (7.93 mM) pero mayor que las de leucina (2.71 mM) y fenilalanina (1.03 mM). El Jmax (1.13 nmol·mg^{-1}·s^{-1}) fue significativamente menor que el de aa neutros. A mayores concentraciones es aparente un fenómeno de transestimulación del transporte de lisina. La arginina inhibió la captación de lisina-H^3.

Se concluye que la captación basolateral de lisina por las glándulas oxínticas es mediada por un sistema (semejante al "y") con moderada afinidad y baja capacidad.

BIOLOGIA CELULAR

95

REGULARIZACION DE LA BIOMINERALIZACION: ROL DEL COLAGENO TIPO X. (Regulation of the biomineralization: role of type X collagen).

Arias, J.L. Caplan, A.I. Departamento de Biología Animal Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile y Skeletal Research Center, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA.

La cáscara del huevo de aves ha sido usada ampliamente por nosotros como modelo de biomineralización. La Calcificación de la cáscara ocurre por precipitación de cristales de calcita sobre un matriz extracelular orgánica que esta en estrecha asociación con las membranas fibrilares no mineralizadas de la cáscara. El análisis inmunohistoquímico y bioquímico de la cáscara de huevos y del istmo del oviducto de gallina muestra la presencia del colágeno tipo X. Con idénticas técnicas se demuestra la presencia adicional de colágeno tipo I sólo en las membranas obtenidas desde el oviducto antes que la calcificación haya ocurrido. El tratamiento con pepsina de las membranas de cáscaras completas revela el epitope para este colágeno. El cultivo experimental de células osteogénicas sobre membranas de la cáscara produce una excepcional mineralización de estas estructuras, pero sólo, si parte o todo el colágeno tipo X ha sido removido.

Tales observaciones sugieren que el colágeno tipo X puede ser responsable de inhibir el depósito de mineral y con ello delimitar las regiones donde ocurre la precipitación de mineral tanto en la cáscara del huevo (carbonato de Ca) como en la osificación endocondral (fosfato de Ca).

96

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE PROTEOGLICANES DE HEPARAN SULFATO PRESENTES EN LA SUPERFICIE DE CELULAS MUSCULARES ESQUELETICAS. (Isolation And Characterization Of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans From the Cell Surface of Skeletal Muscle).

Campos, A. y Brandan, E. Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Varios proteoglicanes (PGs) han sido aislados y caracterizados desde la matriz extracelular de músculo esquelético en mamíferos. Sin embargo, no existe información respecto de la presencia de PGs asociados a la membrana plasmática en este tejido. Por este razón hemos estudiado la presencia de PGs presentes en la superficie de miotubos diferenciados *in vitro*, provenientes de una línea celular de músculo esquelético de ratón (C_2C_{12}).

Solubilización diferencial de PGs utilizando ácido fítico (solubiliza PGs periféricos), Tritón X-100 (solubiliza PGs asociados a la membrana), Tripsina (solubiliza PGs expuestos a la superficie) y sales de guanidina (solubiliza PGs asociados a la matriz extracelular), indican que un 35% del total de los PGs estan localizados en la superficie celular. Los PGs solubilizados por Tritón X-100 fueron separados por cromatografía en DEAE-Sephacel, Sepharose CL-6B y SDS-PAGE. Tres PGs de heparán sulfato (PGHS) fueron encontrados luego del fraccionamiento en Sepharosa CL-6B con un Kav 0.28, 0.60 y 0.80 representando el 11, 33 y 38% respectivamente, de la población de PGHS presentes en la superficie celular. Por otro lado, el ácido fítico solubilizó sólo un PGHS el cual eluye con un Kav de 0.28 en una columna de Sepharose CL-6B. Al utilizar anticuerpos generados contra PGHS unidos a la membrana plasmática vía fosfatidil inositol (Carey y Stahl, J. Cell Biol. 111:2053-2062, 1990), se obtuvo una reacción cruzada para el PGHS con Kav 0.28 solubilizado tanto con Tritón X-100 como con ácido fítico, sugiriendo la presencia de un PGHS anclado vía fosfatidil inositol en la superficie de la célula muscular esquelética.

En la actualidad estamos evaluando la relación entre estas dos formas de PGHS y su localización en la superficie del músculo esquelético.

(FONDECYT 569-89).

97

EXPRESION DIFERENCIAL DE m-RNA PARA MATRIZ EXTRACELULAR POR CULTIVOS DE ESTROMAS HEMATOPOYETICOS (Differential m-RNA expression for extracellular matrix by hemopoietic stromas).

Fernández,M., Chichester, C.O.* y Minguell,J.J. Unidad de Biología Celular,INTA. Universidad de Chile y *Dept. of Pharmacol and Toxicology, Univ.of Rhode Island.

Las células de estroma hematopoyético producen componentes de matrix extracelular (MEC), que junto con factores de crecimiento generan un microambiente para la adhesión, migración proliferación y diferenciación de la célula troncal. La producción de una matriz de fibronectina (FN), parece favorecer la adhesión de precursores hematopoyéticos tempranos CD34+; en cambio matrices enriquecidas en isoformas de colágeno favorecerían procesos de migración y diferenciación.
Indistintamente se ha utilizado cultivos de células de estroma aisladas o estroma completo para estudiar procesos hematopoyéticos. Para definir ambos sistemas celulares desde el punto de vista de generación de MEC, hemos determinado niveles de mRNA para colágenos y fibronectina. Estos estudios se realizaron en cultivos de fibroblastos y cultivos de largo término de médula ósea humana (MOH), este último, equivalente al estroma hematopoyético. La síntesis de colágeno se midió por incorporación de prolina-3H a material colagenasa sensible y los colágenos intersticiales se caracterizaron por cromatografía en DEAE-celulosa. La medición de niveles de mRNA se realizó por hibridación con sondas para colágenos I, III, IV y VI, y FN.
Tanto fibroblastos como estromas completos expresaron mRNA para estos componentes de matriz. Sin embargo, la producción de mRNA para fibronectina fue mayor en estroma que en fibroblastos, derivados de una misma MO. Contrariamente, la producción de m-RNA para colágeno fue menor en estroma que en fibroblastos. La síntesis de colágeno determinada en el medio condicionado de ambos cultivos fue mayor en fibroblastos que en estroma completo.
Estos resultados sugieren que desde un punto de vista de producción de MEC, fibroblastos de MOH no son equivalentes a estroma completo, y que probablemente las interacciones celulares, como asimismo la producción de varias citoquinas presentes en el estroma, modulan la expresión y depósito de FN y colágeno.

Proyecto DTI B-3006-9012

98

MATRIZ EXTRACELULAR Y COMPARTAMENTALIZACION DEL MUSCULO DURANTE EL DESARROLLO. (Extracelular matrix and muscle compartmentalization during development).

Fernández, M.S., Dennis, J.E. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Skeletal Research Center, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA.

El desarrollo del músculo involucra una compleja interacción entre diversos tipos celulares y componentes de matriz extracelular, entre otros, los proteoglicanos.
Para especificar su rol se siguió la localización inmunohistoquímica de diferentes epítopes de glicosaminoglicanos y núcleo protéico de proteoglicanos durante el desarrollo de músculo de embrión de pollo mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

Epítopes característicos de codroitin 4, 6 y dermatan sulfato, queratan y heparan sulfato, y proteoglicanos de músculo y mesenquimáticos, se muestran distribuidos no uniformemente, y amenudo aparecen o desaparacen secuencialmente durante el desarrollo. Nuestros resultados muestran que existen compartimentos o microambientes específicos de matriz extracelular en el músculo, cada uno con su patrón de distribución y momento de ensamblaje característico durante el desarrollo. El cambio de la naturaleza ó distribución de los proteoglicanos constituyentes se interpreta como un paso desde una matriz extarcelular plástica que está presente durante la diferenciación temprana y la determinación de la morfogénesis de las masas musculares, hacia una matriz más rígida relacionada con la manteción de la organización estructural del tejido muscular adulto.

99

EXPRESION DIFERENCIAL DE MACROMOLECULAS SULFATADAS DURANTE DIFERENCIACION DE GLANDULAS GASTRICAS DE EMBRION DE POLLO. (Differential expression of sulfated macromolecules during diferentiation of gastric glands of chick embryo).

Núñez, R. y cols. Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: E. Brandan).

La Matriz Extracelular (MEC) está compuesta de una gran variedad de macromoléculas, las cuales participan en la diferenciación de órganos y tejidos. Con el objeto de caracterizar las relaciones temporales y posiblemente causales de la injerencia del medio extracelular en la regulación de la diferenciación epitelial, hemos estudiado y caracterizado las diferentes macromóleculas sulfatadas presentes en la MEC de proventrículo de embrión de pollo, durante el desarrollo (día 10 al 18).
El embrión se inyectó por vía endovenosa con [^{35}S]-sulfato y luego de 18 horas de incubación, la incorporación del precursor radioactivo fue cuantificado en homogenizados totales; encontrándose un importante aumento en la incorporación de sulfato entre los días 11-13, la cual se mantiene hasta el día 18. Caracterización de las macromoléculas sulfatadas a través de cromatografías de intercambio iónico, de exclusión molecular y fraccionamiento en geles de acrilamida (SDS-PAGE), sugieren la existencia de a lo menos tres PGs de diferente tipo, tamaño y composición porcentual, los cuales se expresan durante la diferenciación. En el día 15 del desarrollo, se encontró la expresión de a lo menos cuatro sulfoproteínas de peso molecular 16, 25, 35 y 59 KDa. Algunos de estos componentes sulfatados se han localizado, histoquímicamente, en las diferentes etapas de la diferenciación glandular.
La expresión diferencial durante el desarrollo de estas macromoléculas sulfatadas sugiere que jugarían un rol muy importante durante diferenciación tisular.

(FONDECYT 769-90 y 569-89)

100

IDENTIFICACION DE LA POBLACION INICIAL DE CELULAS OXINTICAS EN GLANDULAS GASTRICAS DE EMBRIONES DE POLLO. (Identification of the initial population of oxyntic cells in chicken embryo gastric glands)

Koenig, C. Munizaga, A. y Dabliá M. Dpto. de Biología Celular, Fac. Ciencias Biológicas, P. U. Católica de Chile.

Durante la diferenciación de los tubulitos glandulares gástricos, en embriones de 8-10 días, ocurre proliferación celular con desarrollo de túbulos a partir del epitelio de revestimiento. Los tubos primarios se ramifican y desde ellos se desarrollan túbulos secundarios que, hacia el día 14, presentan reacción K-NPPasa (+) en su borde luminal (Koenig et al. 1990). La presencia en sitios de la enzima marcadora de membranas del polo secretor, que contienen la bomba de protones gástrica, muestra que han expresado uno de los fenotipos de las células oxínticas.
Se analizó la expresión de los caracteres distintivos de la célula oxíntica, en este período de la diferenciación. Se usaron estómagos de embriones de 6 a 15 días de edad. Se realizaron análisis: bioquímicos e histoquímicos de enzimas marcadoras del polo secretor y de mitocondrias; de ultraestructura al M.E.T.; de localización del citoesqueleto de F-actina; de distribución de laminina y fibronectina asociadas a los túbulos glandulares (Dabliá et al. 1990) y por PAGE de los polipéptidos presentes.
Al relacionar el contenido en enzimas marcadoras con el de ADN/mg de tejido, entre los días 10 a 14, se observa una notable diferenciación de las células glandulares. Esta se acompaña de redistribución de las células del epitelio pluriestratificado de los túbulos glandulares primarios y formación de los túbulos secundarios monoestratificados. Durante estos cambios ocurren modificaciones en el patrón de polipéptidos.
Los túbulos secundarios muestran una gradiente en la diferenciación de sus células, con las más diferenciadas en la región superior. Los caracteres fenotípicos se expresan como un aumento del número de mitocondrias y la generación de profundos canalículos intercelulares ricos en prolongaciones luminales con membranas K-NPPasa (+). El sistema tubular se observa en las células de la porción superior. La superficie celular basal presenta inmunoreactividad para laminina y fibronectina, con mayor concentración de fibronectina hacia la base del túbulo y de laminina hacia la zona superior.
La diferenciación de las células oxínticas dependería de la expresión de factores que se inducirían al estructurarse los túbulos secundarios de las glándulas gástricas en desarrollo embrionario, observándose una clara gradiente que operaría a lo largo del túbulo glandular.

Financiamiento : Proyecto FONDECYT 769/90.

101

CO-EXPRESION DE LAS INTEGRINAS VLA-4 Y VLA-5 EN PRECURSORES ERITROBLASTICOS HUMANOS Y SU ROL EN LA ADHESION A LA FIBRONECTINA. (Coexpresion of integrins VLA-4 and VLA-5 in immature human erythroblastic precursors and their role in fibronectin adherance). Rosemblatt M., Gaugler MH., Leroy C., Coulombel L. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Institut Gustave Roussy, Paris France.

Los precursores tempranos de los eritroblastos humanos adhieren a la fibronectina (FN) pero la naturaleza de los receptores involucrados se desconoce. Con el fin de entender el rol de la adhesión celular en los procesos de proliferación y diferenciación en el sistema hematopoiético, hemos comenzado estudios dirigidos a identificar los receptores implicados en las interacciones entre precursores eritroblásticos y linfoides con componentes estromales (células del estroma y matriz extracelular). En el presente informe presentamos resultados de experimentos de inmunoprecipitación y funcionales (bloqueo de la adhesión) con anticuerpos específicos y péptidos derivados de los dominios funcionales de la FN que demuestran que las células precursoras de los eritroblástos humanos expresan en la superficie las integrinas VLA-4 y VLA-5 y que ambas median la interacción de estas células con la FN. Un anticuerpo policlonal que reconoce la subunidad $\beta 1$ común a la familia de las VLA inmunoprecipita dos polipéptidos de 150 kD y 160 kD. Los resultados de geles en condiciones reductores y no reductora indican que la banda de 160 kD contiene dos polipéptidos correspondientes a las subunidades α de las cadenas $\alpha 4$ y $\alpha 5$. Esto ha sido confirmado en inmunoprecipitados de lisados de eritroblastos en 0,3% CHAPS con AcMo específicos. Un AcMo que reconoce la cadena $\alpha 4$ de la integrina precipita un heterodímero con péptidos de 125 kD ($\beta 1$) y 160 kD ($\alpha 4$) ademas de dos productos tripticos de 70 kD y 80 kD que normalmente coprecipitan con la cadena $\alpha 4$. Por otro lado anticuerpos específicos de la cadena $\alpha 5$ inmunoprecipitan el complejo $\alpha 5\beta 1$ compuesto de péptidos de 125 kD ($\beta 1$) y 160 kD ($\alpha 5$) que bajo condiciones reductoras migran como una sola banda de 130 kD. Experimentos funcionales con AcMo o péptidos derivados de la FN capaces de inhibir la adhesión demuestran que ambos receptores son funcionales y que cada uno interactúa con dominios de adhesión diferentes de la molécula de FN. Experimentos similares efectuados con una línea leucémica eritroide (KU 812) muestran que esta línea celular también posee estas dos integrinas pero que solo VLA-5 actúa como receptor para la FN.

102

CAMBIOS EN LOS PROTEOGLICANOS DEL DISCO INTERVERTEBRAL CANINO ASOCIADO A DISCOPATIAS. Silva, N., Farías, G., Araya, N., Garcés, H. Depto. Patología Animal, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile.

La matriz extracelular con sus componentes celulares, fibrilares y sustancia amorfa ha sido estudiada en el disco intervertebral normal del canino. Las patologías que afectan a la columna vertebral y por ende al disco intervertebral se inician y perpetúan con modificaciones de sus estructuras básicas, consistentes en alteraciones en la génesis y tipificación del colágeno, como igualmente disminución de proteoglicanos y agua.

Se estudiaron discos intervertebrales de caninos afectados por parálisis debida a alteraciones de la columna verte bral lumbar con calcificación de discos.

En los cortes histológicos se aprecian cambios morfológicos en relación a los componentes celulares con una ten dencia al aumento en el número de células especialmente de tipo cartilaginoso, lo cual se observa tanto en las tinciones H y E como Safranina. En algunos discos el anillo fibroso presenta discontinuidad en su estructura, evidenciando una alteración en los componentes de la matriz extracelular demostrada por una menor afinidad con el colorante catiónico Safranina, específico para proteoglicanos.

Se realizaron ensayos bioquímicos en relación a los proteoglicanos de la matriz extracelular de estos tejidos comprobándose una dismninución de su concentración determina da como sustancia seca o por la presencia de ácido urónico que permite cuantificar GAGs totales, aunque se mantienen las proporciones en las diversas zonas del disco. La migración electroforética (acetato de celulosa en HCl) indica que no hay variación en los componentes (predominando condroitin-sulfato) pero sí en su concentración.

Proyecto DTI 2939-9033.

103

ESTUDIO PRELIMINAR DE ALGUNOS PARAMETROS SISTEMICOS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. (Preliminary study of some systemics parameters in patients with Alzheimer's disease) Alarcón R.A. y Arriagada J.R. Unidad de Neurobiología Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas y Fac.de Medicina, P. Universidad Católica de Chile.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más frecuente entre los adultos mayores de 65 años de edad. Las alteraciones neuropatológicas observadas incluyen atrofia cortical, muerte celular de neuronas colinérgicas y la presencia del péptido beta-amieloide en las placas neuríticas o seniles. El precursor del amieloide también se ha encontrado en tejidos periféricos.

Hemos iniciado la búsqueda de un marcador sistémico que ayude a un diagnóstico precoz de EA utilizando células sanguíneas. En linfocitos, monocitos y en plaquetas se evaluó la Acetilcolinesterasa (AChE) enzima que está muy disminuída en pacientes con EA. Además se analizó la Butiril-ChE (BuChE). En plaquetas se midió también la captación y contenido de Serotonina (5-HT). Nuestros resultados indican para individuos normales (n=15) una actividad promedio para AChE de 5.7, 1.7 y 3.4 ; y en BuChE de 4.4, 4.6 y 17.7 mU/mg de proteínas en linfocitos, monocitos y plaquetas respectivamente. La captación de 5-HT en plaquetas dió una V_{max} de 4.6×10^3 cpm/10^8 cel. y su Km fue de 2.1 uM. El contenido de 5-HT fue de 221 ng/10^9 cel.

Actualmente estamos analizando muestras obtenidas de pacientes con EA.

Financiado por el proyecto Fondecyt (0651/91) al Dr. Nibaldo C. Inestrosa.

104

ADHESION CELULAR EN LINEAS CELULARES QUE EXPRESAN AMIELOIDE Y ACETILCOLINESTERASA (AChE) (Cellular adhesion in cell lines which express amyloide and AChE) Palma V.A. y Godoy J.A. Unidad de Neurobiología Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas y Medicina, P. Univ. Católica de Chile. (Patrocinio: N.C. Inestrosa).

Las células de hepatoma humano (Hep-G2) codifican para la proteína precursora del amieloide, la cual ha sido recientemente involucrada en la Enfermedad de Alzheimer (EA). Actualmente estamos realizando estudios de adhesión de células humanas Hep-G2 y fibroblastos de ratón 3T3, a diferentes matrices extracelulares con el objeto de definir el papel que éstas ejercerían sobre la expresión génica. Estos estudios se enmarcan en la idea de conocer si existen alteraciones en el proceso de adhesión celular en la EA.

Nuestros resultados muestran la presencia de AChE en células Hep-G2, enzima marcadora de neuronas colinérgicas, la que está disminuída en EA. Los fibroblastos 3T3 presentan una mayor y más rápida adherencia a colágeno y en menor grado a gelatina y plástico. La adhesión de Hep-G2 es menor y con un lag temporal mayor en relación a células 3T3. Experimentos en gradientes de sacarosa (5-20%) indican que ambas líneas celulares expresan una forma molecular de la AChE.
Los resultados obtenidos en Hep-G2 y 3T3 nos permiten definir sistemas de estudio para aplicarlos luego a EA.

Financiado por el **Proyecto FONDECYT (0651/91) al Dr. Nibaldo C. Inestrosa.**

105

RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (REGF) EN ENCEFALO DE RATAS. DIFERENCIAS REGIONALES Y ENDOCITOSIS EN SINAPTOSOMAS. (Epidermal Growth Factor Receptor in Rat Encephalon. Regional differences and endocytosis in synaptosomes) Faúndez V. y González, A. Depto Biol. Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas y Depto Reumatología Clínica e Inmunología, Fac. Medicina, U. Católica.

El EGF interacciona con su receptor en la membrana plasmática con distintas características cinéticas de afinidad dependiendo del sistema celular estudiado. La función receptora está sujeta a control mediante cambios de afinidad producida por diversos factores y mediante endocitosis del receptor inducida por EGF. En este trabajo mostramos diferencias en los parámetros de unión de ^{125}I-EGF a sinaptosomas de rata adulta obtenidos de corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. Corteza e hipocampo poseen mayor numero de sitios de unión de ^{125}I-EGF (70-80 fmoles/mg) que cerebelo (18 fmoles/mg). En hipocampo y corteza detectamos dos sitios con afinidad distinta de Kd: 10^{-11} y 10^{-10} M y de 10^{-10} y 10^{-9} M, respectivamente. En cambio, en cerebelo observamos sólo un sitio de Kd: 10^{-10} M. Encéfalos de ratas neonatales expresan dos veces más receptor que el encéfalo adulto. Además, encontramos que los sinaptosomas son capaces endocitar y degradar EGF en concentraciones nM. Esta endocitosis es temperatura y ATP dependiente y es bloqueado por exceso de EGF frio. La degradación es inhibida por cloroquina y monensina. Ratas neonatales muestran mayores niveles de endocitosis mediada por REGF.

Nuestros datos sugieren que existirían mecanismos región-específicos moduladores de la función del REGF en encéfalo y que el REGF podría reciclar en la región sináptica.

(Financiado por proyectos Fondecyt #249/88 y 721/91. V.F. es becario de la Fundación Andes).

106

EFECTO DE IGF-I y bFGF SOBRE LA RECUPERACION FUNCIONAL DEL NERVIO CIATICO LESIONADO. (Effects of IGF-I and bFGF upon the functional recovery of the lesioned sciatic nerve).
Luis Medina, Jorge Vergara, José Maulén y Jaime Alvarez. Unidad de Neurobiología Molecular. P. Universidad Católica. Santiago.

Los factores de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) e insulínico I (IGF-I) prolongan la vida de neuronas en cultivo y estimulan la elongación de neuritas. Estudiamos el efecto de la aplicación local de IGF-I y bFGF sobre la velocidad de regeneración del nervio ciático de rata, la maduración de los axones y el restablecimiento de la función neuromuscular.

Se atricionó el nervio ciático y se colocó un papel de nitrocelulosa solo o cargado con 2-4 ug de IGF-I o bFGF, 2 mm bajo la atrición. Los animales se estudiaron hasta el día 85 post-lesión.

La velocidad de regeneración de los axones fue discreta pero significativamente mayor en los nervios tratados. En las etapas precoces se detectó diferencias citológicas entre los nervios tratados y controles. La trasmisión sináptica del músculo tibial anterior se reinició 2 días antes que en controles; asimismo, la recuperación de la marcha se inició el día 11 post-lesión (control, día 13). La recuperación de la velocidad de conducción de los nervios controles y tratados fue comparable. El peso del triceps sural y la tensión desarrollada no difirió de los controles.

Los resultados indican que la aplicación local de IGF-I y bFGF aceleran discretamente el proceso regenerativo.

(Proyecto FONDECYT 493/89)

107

EFECTO "IN VITRO" DE FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO (FGF) EN CULTIVO PRIMARIO DE NERVIO AISLADO ("In vitro" effect of FGF upon isolated nerve in primary culture). *Moreno R. Unidad de Neurobiología Molecular, Dpto. Biología Celular y Molecular, P. U. Católica de Chile.

Desarrollamos un cultivo primario de neuronas para ensayo de factores de crecimiento y tróficos como etapa previa al estudio "in vivo".

Nervios con ganglio espinal, aislados de *Xenopus laevis*, fueron incubados en medio Dulbeco (MEMD), MEMD+insulina (0,01 Ug/ml) y MEMD+insulina+suero fetal de bovino (10%). Utilizamos como parámetro de estabilidad del sistema a la acetilcolinesterasa (AChE), determinando sus niveles totales y las formas moleculares por gradientes de sacarosa.

Nuestros resultados indican que en las condiciones de cultivo: (1) no se produce muerte neuronal al examen histológico, (2) no se afectan los niveles de AChE, (3) la distribución de la AChE a lo largo del nervio es constante, (4) en el ganglio existe un orden de magnitud superior de AChE que en el nervio y, (5) en presencia de FGF, los niveles de AChE aumentan 2 veces en el ganglio, no así en el nervio.

Concluímos que la neurona sensitiva es tejido blanco de FGF y que la preparación es apropiada para estudios de neuronas aisladas con sobrevida de alrededor de 7 días.

Proyecto **FONDECYT 493/89**. *Becario CONICYT.

108

EFECTOS DEL EGF Y PDGF EN CELULAS DE MUSCULO LISO VASCULAR DE RATAS MILAN NORMALES E HIPERTENSAS. (Effects of EGF and PDGF in vascular smooth muscle cells from Milan normal and hypertensive rats). Salazar, G., Canessa, M. Werner, E., (Patrocinio: J. Garrido). Depto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Esc. de Medicina, P. Universidad Católica de Chile & Endocrine-Hypertension Division, Brigham and Women's Hospital, Boston.

Células musculares lisas de aortas (MLA) de ratas genéticamente hipertensas de la cepa Milan (MHS) muestran una mayor tasa de proliferación que la cepa normotensa (MNS) en cultivo primario con suero. El mecanismo responsable de la mayor proliferación de las células MHS es desconocido. En este trabajo se estudiaron efectos mediados por los receptores de factores de crecimiento epidérmico (EGF) y derivado de plaqueta (PDGF).

Al estimular células MLA quiescentes de la cepa MHS con EGF o con PDGF se observó un aumento de 2 y 5 veces, respectivamente, en los niveles de incorporación de ^{3}H-timidina. Las células normotensas no dan respuesta significativa al EGF y presentan una menor respuesta al PDGF. Estos efectos se correlacionaron con un mayor contenido de receptores por célula para ambos factores. Además, se observó que el PDGF produce una mayor estimulación del cotransporte Na-K-Cl en las células MHS, ya sea quiescentes o crecidas en presencia de suero, comparadas con las MNS. Los resultados sugieren que el PDGF podría tener una importante contribución en la mayor proliferación de las células MLA de las ratas hipertensas y en el aumento de la resistencia periférica.

(Financiado por Proyectos Fondecyt 241/88 y 721/91. E. W es instructor becario de la P. Universidad Católica de Chile).

109

REGULACION DE LA EXPRESION GENICA DE LA CASEINA Y α-LACTALBUMINA POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO BASICO EN CELULAS EPITELIALES MAMARIAS*. (Regulation of casein and α-lactalbumin gene expression by basic fibroblast growth factor on mammary epithelial cells).

Tapia, V., Lavandero, S. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Recientemente hemos demostrado que el factor de crecimiento fibroblástico básico, un polipéptido de 14kDa y naturaleza catiónica, es un potente estimulador de la proliferación in vitro de las células mamarias epiteliales normales.

En este trabajo se determinó la acción del bFGF sobre la expresión de proteínas marcadoras específicas del tejido mamario diferenciado: caseína y α-lactalbúmina utilizando cultivos primarios de células epiteliales mamarias obtenidas de ratones hembras preñadas. Se cuantificaron la secreción y expresión de estas proteínas por inmunoprecipitación y sondas de RNA complementarias.

La expresión de los genes y síntesis de caseína y lactalbúmina por hormonas lactogénicas (prolactina, insulina e hidrocortisona) aumentó 2,5 veces al someter previamente las células mamarias a la acción del bFGF (5ng/ml). En cambio el tratamiento de estas células con bFGF y hormonas lactogénicas en forma simultánea redujo a la mitad la secreción de las proteínas marcadoras sin alterar su síntesis.

Nuestros resultados indican que el bFGF, en conjunto con las hormonas lactogénicas, participarían en la regulación de la expresión génica de la glándula mamaria de la rata.

*FONDECYT 91-0879 y 0880, DTI B-31139013 y Postgrado U. Chile 91-001. SL es becado de Fundación Andes.

110

VARIANTES DE HISTONAS, PROLIFERACION Y DIFERENCIACION EN *T. cruzi*. (Histones variants, proliferation and differentiation in *T. cruzi*).

Toro, G.C.; Jaramillo, N.C.*, y Galanti, N. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

En la familia Trypanosomatidae se ha determinado diferentes actividades proteolíticas. En *T. cruzi* la mayoría de ellas puede clasificarse como cistein proteinasas. Por otro lado se ha descrito presencia de proteinasas que degradan histonas en la preparación de cromatina de distintas especies.

En este trabajo se muestra diferentes actividades proteolíticas sobre histonas de *T. cruzi*, según el estado proliferativo y de diferenciación del parásito.

Se obtuvo histonas de *T. cruzi* a partir de epimastigotes con alta y baja actividad proliferativa, así como de tripomastigotes no replicativos e infectivos.

Cultivos en crecimiento logarítmico mostraron las seis histonas típicas de este parásito, mientras que epimastigotes de fase estacionaria presentaron dos nuevas variantes. Finalmente la forma tripomastigote mostró ausencia de una histona principal. Estos resultados sugieren la presencia de variantes de histonas relacionadas con la actividad proliferativa del parásito . Se examinan actividades proteolíticas probablemente involucradas en estos cambios.

DTI DB 3212-9013, Fondecyt 096-89, Proyecto SAREC.
*** Becado OMS : MB/181/4/J.79.**

111

EFECTO DE PROLACTINA EN LA DIFERENCIACION DE MEDULA OSEA "in vitro". (Effect of Prolactin on the differentiation of bone marrow cells "in vitro").

Barría, M., Mena, M. y Esquivel, P. Inst. Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

En el último tiempo hemos estudiado el efecto que factores neuroendocrinos tienen en la diferenciación de células de médula ósea (MO) hacia células Thy1 positivas. Para ello se ha desarrollado un sistema de cultivo "in vitro" en dos etapas, que consiste básicamente en el cocultivo por una hora a 37ºC de timo e hipófisis en presencia de extractos hipotalámicos (EH) o neuropéptidos (etapa 1). En seguida se obtiene sobrenadante que se agrega a una suspensión de células de MO y se cultiva por una hora adicional, midiéndose entonces la aparición de células Thy 1 positivas mediante técnica de exclusión de colorantes vitales.

En el cultivo mencionado se probaron diferentes neuropéptidos o mediadores. Los resultados demuestran que: 1.- Prolactina es un eficiente diferenciador cuando timo está presente en el medio de cultivo, aún cuando los valores logrados no alcanzan los niveles inducidos por EH; 2.- Prolactina no tiene efecto al actuar directamente sobre médula ósea; 3.- Llama la atención que la hormona del crecimiento (GH) no muestra efecto en este modelo; 4.- Somatostatina no muestra efecto diferenciador.

Se discute el posible rol de prolactina como responsable parcial del efecto diferenciador demostrado por EH en el modelo usado.

Proyectos FONDECYT 89-71, DID-UACH S-91-40.

112

PROLACTINA HIPOFISIARIA (Prl) DURANTE LA ACLIMATIZACION DEL PEZ *C. carpio*. (Hypophisiary prolactin during the aclimatization of the fish *C. carpio*).

J.Figueroa, A.Molina, M.Alvarez , A. I. Siegmund,* y J. Villanueva. Instituto de Bioquímica e Instituto de Histología y Patología,* Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

La carpa (*Cyprinus carpio*), como todos los ectotermos eurioicos, está sometida a variaciones cíclicas del ambiente, en especial, aquellas que derivan de las características estacionales. Como respuesta a los cambios físicos (e.g. temperatura y fotoperiodo), el pez debe elaborar respuestas compensatorias que permitan su adecuada sobrevivencia. En nuestro laboratorio postulamos que la respuesta compensatoria conlleva reprogramación de la expresión génica, y que el eje hipotálamo-hipofisiario estaría comprometido en la transducción de las señales que el cambio estacional genera.

Hemos iniciado la aproximación de este estudio evaluando el contenido de Prl hipofisiaria mediante técnicas inmunocitoquímicas utilizando anticuerpos anti-Prl de ovino el cual reacciona con Prl de carpa. Los resultados muestran un bajo contenido de Prl durante el periodo invernal , el que aumenta gradualmente durante el mes de noviembre. Este alcanza su máximo en enero y comienza a declinar a partir de marzo, volviendo a los niveles mínimos invernales. Esta observación se ratificó tanto en el contenido por célula (intensidad de tinción) como en el número de células que se tiñen. Concomitantemente, la ultraestructura nucleolar de estas células exhibe notorios cambios. En efecto, en invierno existe una segregación nucleolar y en verano una total integración.

Estos estudios establecen los primeros hallazgos acerca de la variación en la producción de Prl hipofisiaria durante el proceso de aclimatización, y su coincidencia respecto a la existencia de una depresión de la transcripción de genes de rRNA en la reprogramación que caracteriza a la respuesta compensatoria que ocurre durante los cambios estacionales. (Financiado por proyecto FONDECYT 0905/91., DIC-UACh y OEA)

113

EFECTO DE MELATONINA SOBRE LA SINTESIS DE TESTOSTERONA EN CELULAS DE LEYDIG.(Effect of melatonin on the synthesis of testosterone in Leydig cell).

Moraga, P.*, Vera, H. y Valladares, L. Unidad Biología de la Reproducción. INTA, Universidad de Chile. *Becario CONICYT.

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que melatonina actúa directamente sobre la función endocrina testicular. El efecto de melatonina no interfiere con la interacción de la gonadotrofina con su receptor ni con la producción de AMPc intracelular.
En este estudio analizamos qué etapa de la vía esteroidogénica se altera por acción de melatonina 10^{-6} M in vitro. Células de Leydig de testículos de ratas entre 35-40 días, se incubaron bajo distintas condiciones experimentales: a) incubación de las células con 22(R)-OH-colesterol, pregnenolona (3 uM), progesterona (1 uM) o androstenediona (1 uM); b) incubación con ^{3}H-pregnenolona. La cuantificación y caracterización de cada uno de los productos formados en cada procedimiento experimental se analizaron por ITLC, HPLC o RIA.
Utilizando el procedimiento a), al incubar las células en presencia o ausencia de hCG observamos que el efecto de melatonina no era revertido en presencia de colesterol hidroxilado. Asimismo, al incubar células con pregnenolona se observó que la síntesis de testosterona estaba drásticamente inhibida (64%). Más aún, cuando en experimentos paralelos al incubar células con hCG la producción de pregnenolona (10,3 pmoles/10^6 células) se incrementó (18.1 pmoles/10^6 células) en presencia de melatonina. En el proceso experimental b), incubando las células con ^{3}H-pregnenolona se estableció que había acumulación de 17-OH-progesterona. Todos estos resultados junto a los obtenidos, al incubar las células con progesterona y 17α-OH-progesterona y la posterior medición de testosterona, establecieron que melatonina inhibe directamente la esteroidogénesis testicular, al igual que otros reguladores paracrinos y autocrinos (AVP, AVT y LHRH), en la etapa catalizada por la enzima 17-α-OHasa/17,20 liasa.
Financiado por Proyecto Fondecyt Nº1024-89.

114

CININOGENOS DE ALTO (HK) Y BAJO (LK) PESO MOLECULAR EN NEUTROFILOS HUMANOS AISLADOS. (High and low molecular weight kininogens on isolated human neutrophils).

Figueroa CD[1], Henderson LM[2], Kaufmann J[3], De la Cadena RA[4], Colman RW[4], Müller-Esterl W[3], Bhoola KD[5]. Instituto de Histología y Patología[1], Universidad Austral, Valdivia; Departments of Biochemistry[2] & Pharmacology[5], University of Bristol, U.K.; Department of Pathobiochemistry[3], University of Mainz, Germany; Thrombosis Research Center[4], Temple University, U.S.A.

Se investigó, mediante inmunocitoquímica a microscopía óptica y electrónica, la presencia y distribucion subcelular de los cininogenos HK y LK en leucocitos humanos.
Los leucocitos se aislaron mediante sedimentación en dextrano y centrifugación en Ficoll-Hypaque. Se utilizó inmuno-oro-plata, microscopía confocal e inmuno-oro a microscopía electrónica. El anticuerpo monoclonal contra HK reconoce un segmento de la cadena liviana de 46-kDa mientras que el anti-LK fue producido contra una porcion del extremo carboxiterminal (aminoacidos 389-409) de la cadena liviana de LK, la única que es distinta de HK. Describimos por primera vez la presencia de LK en neutrófilos humanos y demostramos que ambos cininogenos se localizan solo en la membrana celular del neutrófilo. No se observó HK o LK intracelularmente en células permeabilizadas con 0.1% triton X-100, un método que evidenció elastasa en los granulos azurofilos.
El cininogeno presente en la superficie del neutrófilo podría actuar como receptor para calicreinas y/o servir de fuente para producir una formación circunscrita de cininas, que podrían a su vez mediar la diapedesis de los neutrófilos asi como la formación de edema durante la inflamación aguda.

Financiado por FONDECYT (91/0961), DID-UACH (S/91/32), MRC U.K., Wellcome Trust U.K. y SCOR on Thrombosis U.S.A. (HL 45486-01).

115

UN SISTEMA DE VISION ARTIFICIAL APLICADO AL RECONOCIMIENTO DE CELULAS. (An artificial vision system applied to cell recognition).

DOGGENWEILER, C.F., CORDOVA, F. y ARRAU, P. Depto. de Biología, Facultad de Ciencias y Depto de Ing. Industrial, Facultad de Cs. FF. y MM., U. de Chile.

En una comunicación anterior mostramos el uso de un sistema de visión artificial en la detección de micronúcleos en eritrocitos de peces. En esa ocasión señalamos que el sistema estaba parametrizado, por lo que su capacidad de reconocimiento es adaptable para otros objetos. Utilizando un equipo consistente en: microscopio trinocular, cámara de video, computador personal dotado de hardware y software de adquisición de imágenes nuestro software puede reconocer objetos (células) en un fondo con ruido, y prepararlos para su recuento. El software desarrollado tiene -brevemente - las siguientes etapas: 1)Reconocimiento de objetos (detección de bordes cerrados), 2) Listado de ellos, 3) Comparación de invariantes con un patrón determinado por el observador, 4) Eliminación del listado de objetos no adecuados, limpieza de la imagen, 5) Recuento y estadística.

Se destaca: 1) El uso de computador no dedicado 2) El reconocimiento de objetos 2) La capacidad de adaptación.
Financiado por DTI (U de Chile) FONDECYT y la Fundación Andes.

116

EFECTO DE COLCHICINA Y HEAT SHOCK EN LA EXPRESION DEL GEN *mdr* Y GLICOPROTEINA-P EN HIGADO DE RATA (Effects of colchicine and Heat-Shock in the mdr and glicoprotein-P expression in rat liver).

Acuña, C., Yollrath V., Andrade, L., Duarte, I. y Chiasale J. Deptos de Gastroenterología y Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, P.Universidad Católica de Chile.(Patrocinio: Dr. Alfonso González).

La glicoproteína-P (Gp170), o transportador de múltiples drogas,es una proteína localizada en la membrana apical de células epiteliales de riñon, intestino e hígado y es codificada por el gen *mdr* en roedores. En hígado, Gp170 transporta diversos agentes citotóxicos desde el hepatocito a la bilis. El gen *mdr* presenta homología en sus secuencias regulatorias con genes que codifican a las proteínas de heat shock los que se inducen en diversos sistemas biológicos, por efecto del aumento de temperatura (T). Se estudió el efecto de la administración de colchicina, sustrato de Gp170, y el efecto del incremento agudo de T en la expresión del gen *mdr* y la Gp170. Se extrajo RNA total de hígado, riñon, intestino y glándula adrenal a diversos tiempos después de la administración ip. de colchicina (2mg/kg) o después de incrementar la T de las ratas de 36 a 41ºC. Los RNA se hibridaron con el cDNA del MDR1 mediante Northen y Dot Blot. Se realizó análisis inmunohistoquímico en cortes de hígado utilizando el AcMo C219. Se detectó incremento en los niveles del mRNA a las 6 hrs. después de la administración de colchicina, alcanzando el máximo a las 24 hrs. (500%, $p < 0.05$) y retornando a niveles constitutivos de expresión a las 48 hrs. Esta inducción fue órgano específica en el hígado, ya que no se observó cambios en la expresión génica en los otros órganos. En el acino hepático se observó un incremento homogéneo en la distribución del Gp170 a las 48 y 72 hrs., sugiriendo un aumento en la síntesis de la proteína, la que se incorpora en el dominio canalicular de los hepatocitos. No se observaron cambios en la expresión génica inducidos por T o por la administración del compuesto fotoinactivado de colchicina, la luminocolchicina. Esta constituye la primera evidencia de inducción in vivo del gen *mdr* y Gp170 en respuesta a la administración de un sustrato del transportador y sugieren que la expresión de este sistema detoxificador es modulada en el hígado, de manera órgano-específica, en respuesta al daño celular mediado por sustratos citotóxicos.
Financiado por proyecto Fondecyt 0721-90

117

PROGRESION DE LA FASE S Y LOCALIZACION INTRANUCLEAR DE PCNA/CICLINA Y DEL ANTIGENO T MAYOR EN CELULAS TRANSFORMADAS POR SV40. (Progression through S phase and intranuclear location of PCNA/cyclin and T antigen in SV40-transformed cells). ALVAREZ, P.; ORDENES, G.E., PEREZ, I. Y SANTOS, M. Depto. Biologia Celular y Genética, Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

El antigeno tumoral mayor (ag-T) se co-localiza con sitios de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) en una población de células transformadas por SV40 que están en fase S, sugiriendo que podría estar participando en la síntesis del DNA en estas células. En este trabajo se estableció una correlación entre la distribución intranuclear del ag-T y de PCNA/ciclina y la cinética de progresión de las células a través del periodo S. Para ello, se inhibió la síntesis de DNA con hidroxiurea o afidicolina y luego de eliminada la droga se mantuvo los cultivos en presencia de BrdU. A distintos tiempos post-tratamiento las células se procesaron para detectar, por inmunofluorescencia doble indirecta, la BrdU y el ag-T o bien el ag-T y la PCNA/ciclina. A partir de los 10 min y hasta los 60 min la BrdU y la PCNA/ciclina presentan un patrón de puntos fluorescentes que en el tiempo van creciendo y adquiriendo formas variadas. Luego, predomina un patrón de parches fluorescentes que se intercalan con zonas sin reactividad. En todo momento hay una co-localización del ag-T tanto con BrdU como con PCNA/ciclina. Esta es parcial en tiempos tempranos post-tratamiento, probablemente porque la cantidad de ag-T excede la de BrdU o la de PCNA/ciclina, pero se hace total en S medio y fundamentalmente tardío, cuando todos los marcadores adquieren la distribución en parches, que hemos definido previamente como patrón heterogéneo. Estos resultados sustentan la posibilidad que el ag-T participe en la síntesis del DNA celular, lo que podría constituir uno de los factores que determinan que las células transformadas por SV40 se mantengan en contínua proliferación.FONDECYT 1183/90

118

RECAMBIO DE SUBPOBLACIONES DE CELULAS ACINARES EN LA REGRESION POSTHIPERTROFICA DE GLANDULAS PAROTIDAS DE RATON (Renewal of subpopulations of acinar cells during the posthypertrophic regression in mouse parotid glands). Alliende,-C.A., González, M.J. y López Solís, R.O.. Dpto. Biología Celular y Genética, Fac. Medicina, U. de Chile.

La administración crónica diaria de isoproterenol (IPR) produce hipertrofia de las glándulas parótidas, acompañada de marcadas modificaciones en las frecuencias de subpoblaciones de células acinares, definidas éstas por su fenotipo nuclear (mono o binucleadas; contenidos relativos de DNA 2C, 4C, 8C o >8C). Así, al cabo de 7 días de IPR (2 mg. ip. /dia) las células mononucleadas 2C (mono 2C) disminuyen desde un 66% hasta prácticamente desaparecer, las mono 4C se duplican (19 vs 38%) y aparecen poblaciones bi 4C (19%) y mono 8C (14%). La suspensión del tratamiento crónico con IPR (día 0 de regresión) produce regresión al tamaño glandular normal en no más de 10 días. El presente estudio, basado en citofluorometría Feulgen y autorradiografía (3H-timidina), tuvo por objeto caracterizar una eventual involución de las subpoblaciones de células acinares durante la regresión posthipertrófica de las glándulas parótidas.

Alrededor del día 10 de regresión, se apreció por vez primera un significativo incremento en el índice de marcación. En estos primeros 10 días de regresión, la frecuencia de células mono 2C se incrementó a un 17%, las poblaciones mono 4C, mono 8C y bi 2C se mantuvieron (49, 10 y 20%, respectivamente) y las células bi 4C disminuyeron (4%). Entre los días 10 y 24, un 85% de las células acinares eran mono 2C, un 5% mono 4C y un 10% bi 2C. Las células mono 8C y bi 4C desaparecieron en este periodo. Entre los días 24 y 36, la población mono 4C se elevó significativamente (19%), disminuyeron las bi 2C (3%) y reaparecieron células bi 4C (0.5%). Entre los días 36 y 46, se incrementó la población bi 2C (11%) y se mantuvieron las poblaciones mono 2C (73%) y mono 4C (15%). A esta altura de la regresión, las frecuencias de células acinares se asemejan a las observadas en glándulas no estimuladas. Estos datos sugieren que durante la regresión desde el estado hipertrófico inducido por IPR, hay pérdida de la mayor parte de las células acinares y un repoblamiento que implica proliferación celular y tránsito de subpoblaciones mono 2C---bi 2C---mono 4C.

PROYECTOS DTI-3208 y FONDECYT 0793/89

119

GENERACION Y CARACTERIZACION DE ESTROMA HEMATOPOYETICO A PARTIR DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL HUMANO.(Stablishment and characterization of hemopoietic stroma from human umbilical cord blood). Bruzzone,M.S. Unidad Biología Celular. INTA. Universidad de Chile.

El estroma hematopoyético que participa en el anclaje, proliferación y diferenciación de progenitores hematopoyéticos, está formado por varios tipos celulares y sus productos (Factores de Crecimiento y Matriz Extracelular).
La Sangre del cordón umbilical humano(SCUH) al momento del nacimiento es rica en progenitores hematopoyéticos, cuya presencia coincide con la iniciación de la hematopoyésis medular. Sin embargo, no hay evidencias sobre presencia de células de estroma en SCUH y su eventual significado funcional. Para estudiar lo anterior se usaron sistemas de cultivo, a partir de SCUH obtenida de partos de término al momento del corte del cordón. Se aislaron células mononucleadas y se cultivaron bajo diferentes condiciones que incluyeron: tipos de suero (fetal y de caballo), hormonas (Hidrocortisona (HC), Dehidroepiandrosterona-DHA) y nutrientes (Acido Fólico), mio-Inositol y 2-Mercaptoetanol). Se establecieron condiciones óptimas (Medio IMDM suplementado con ácido fólico 10 mg/L, mio-inositol 40 mg/L, suero fetal 10%, HC 10^{-7} M y DHA 10^{-6} M) que resultaron en la formación de una capa adherente heterogena.
Estudios morfológicos, histoquímicos e inmunoquímicos demostraron en cultivos primarios la presencia de macrófagos, células tipo fibroblastos y endotelial, conjuntamente con macrófagos embrionarios. Estos cultivos al ser tripsinizados, generaron monocapas que poseen sólo células tipo fibroblastos y endotelial. Los resultados demuestran que la SCUH posee células de estromas y sugieren que la sangre fetal es un equivalente celular a la médula ósea. Este hallazgo junto al significado ontogenico ofrece un interesante modelo para el estudio del proceso hematopoyético. Financiado por Proyectos DTI B-3006-9012 y Fondecyt 89/990.

120

ROLE DE LAS TIROSINE KINASAS DE LA FAMILIA " SRC " EN LA ACTIVACION CELULAR.
Siegmund Fischer - Directeur de Recherche-INSERM
ICGM - Unite 332 - Paris, FRANCE

Pocos segundos despues de la activacion-via sus receptores normales- los linfocitos y las plaquetas presentan modificaciones importantes por kinasas fosforiladoras de tirosina (TPK) denominadas p561ck y pp60src, respectivamente.
La TPK de linfocitos T (p561ck) es hiperfosforilada en los residuos tyr y ser (determinados por mapeo petidico) en celulas activadas via CD2;CD3 o CD4. P-proteinas de 80 y de 100 kDa fueron co-imunoprecipitadas con la p561ck activada, sugeriendo que se encuentran en las vias de transduccion de senales.
Estudios de la organizacion del gene LCK muestran que posee una estructura similar a los genes de la familia "src". Esto sugiere que el gene LCK se ha formado probablemente por exon shuffling. Hemos construido diferentes mutantes de deletion. Expresados en celulas eucarioticas, nos han permitido mapear sus dominios funcionales.
La estimulacion de plaquetas por la trombina aumenta la fosforilacion en tirosina de varias proteinas. Ademas de la pp60src hemos encontrado proteinas de 120 kDa (PLC-); 85kDa (PI-3-k) y una banda difusa de 75kDa (c.raf), que probablemente intervienen en la senalizacion. Por fraccionamiento subcelular hemos localizado la p60src en los granulos densos, que tienen un rol primordial en la activacion de la plaquetas.
Estos resultados muestran que las TPKs intervienen en la activacion celular, probablemente transduciendo senales generados por la ocupacion de receptores.

121

MECANISMOS DE MIGRACION CELULAR Y EL FENOMENO DE CITOPROTECCION GASTRICA. (Cell migration mechanisms and gastric cytoprotection). Garrido, J., Messen, L., Núñez, P. y Villavicencio, M. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La migración de células constituyentes del revestimiento gástrico resulta un hecho clave en el proceso de restitución de la continuidad epitelial dañada por un agente nocivo. Dicha migración ocurre en breve plazo , e inicialmente repara la lesión mediante el establecimiento de un epitelio de células aplanadas portadoras de caracteres morfológicos que las emparentan con el epitelio original. Empleando un modelo de cultivo organotípico desarrollado para estudiar este fenómeno, y como parte de la caracterización en este modelo del proceso que nos ocupa, hemos estudiado el efecto de drogas que modifican la función del citoesqueleto y de agentes que inhiben la proliferación celular. Entre estos últimos, la administración en el medio de cultivo de 1-[β-D-arabinofuranosil]citosina (ara-C), un inhibidor de la síntesis de DNA, sorprendentemente provoca una importante aceleración de la migración celular. Este resultado plantea la posibilidad de una acción de ara-C sobre elementos del citoesqueleto, sea directa sobre las estructuras presentes en la células, o bien indirecta, a través de cambios en la expresión génica de uno o más componentes de dichas estructuras. (Financiado por Proyecto FONDECYT 528/89).

122

AISLAMIENTO PARCIAL DEL GRANULO DE LA CELULA DE LANGERHANS. (Partial purification of the Langerhans cell granule). Grob F. y Caorsi I. Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. (Patrocinio: C.D. Figueroa).

La célula de Langerhans es una célula dendrítica accesoria del sistema inmune cuya función fundamental es la presentación de antígenos al linfocito T. La célula de Langerhans se localiza de preferencia en la epidermis, siendo su característica ultraestructural más relevante la presencia en su citoplasma de un organelo peculiar de estructura compleja: el gránulo de Birbeck (GB) o gránulo de la célula de Langerhans. Su función es desconocida. En el presente trabajo se describe, por primera vez, un método de aislamiento del GB, como una etapa inicial de la posterior determinación de sus componentes. Láminas de epidermis humana obtenidas por tripsinización (0.5 % por 15 min a 37°C) fueron disgregadas en buffer isotónico con la finalidad de obtener una suspensión celular. Las células fueron centrifugadas a 1000 x g por 10 min y posteriormente, lisadas en 1 mM $NaHCO_3$. Al homogenizado resultante se le aplicó centrifugación diferencial. Los pellets obtenidos fueron procesados para microscopia electrónica con el método del zinc-iodo-osmio que tiñe selectivamente el GB. Los pellets que contenían la mayor cantidad de GB (40.000 x g por 1 h) fueron resuspendidos en buffer isotónico y re-centrifugados a 60.000 x g por 90 min en una solución de sucrosa 35 % p/v . Con este procedimiento se logró eliminar parcialmente membranas contaminantes y obtener un material altamente enriquecido en GB que hará posible su caracterización bioquímica posterior.

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

123

ESTUDIO DEL DAÑO INDUCIDO POR IRRADIACION Y CORTISONA EN CELULAS TIMICAS Y DE GANGLIO LINFATICO DE RATON. (Study of damage induced by irradiation and cortisone on mice thymus and lymph node cells). Maldonado, C., Guarda, M.I., Matamala, M. y Alarcón,C. Instituto de Física, Universidad Austral de Chile. (Patrocinio: Dr. Flavio Ojeda).

Se ha postulado y se acepta que la muerte interfásica radioinducida, característica de las células linfoides, ocurre por la activación de una endonucleasa que fragmenta el ADN en múltiplos de aproximadamente 180 pares de bases. Este proceso, inducido también por cortisona se conoce como apoptosis o muerte programada.

En este trabajo se estudió el daño de membrana y la fragmentación de ADN inducido por irradiación y cortisona en células de ganglio linfático y de timo de ratón. El daño de membrana se determinó por la técnica de exclusión de azul tripán y la fragmentación de ADN en geles de agarosa y por citometría de flujo.

Los resultados muestran que en los timocitos la fragmentación de ADN antecede al daño de membrana, en un proceso sensible a inhibidores de proteína kinasa C (PKC), en cambio en las células de ganglio el daño de membrana precede a la fragmentación de ADN y el proceso no es sensible a inhibición de PKC.

Estos resultados sugieren que la muerte interfásica en el caso de las células linfoides maduras no puede ser atribuído al fenómeno de apoptosis como lo sería en células timicas inmaduras.

Financiado por DID-UACH Proyecto S-89-9.

124

CITOLISIS NK Y FOSFORILACION DE PROTEINAS.(NK Cytolysis and protein phosphorilation). Miranda, D., Parra, S.E., Parra, S. y Puente, J. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Chile. (Patrocinio: M.A. Valenzuela).

La citolisis mediada por las células Natural Killer (CMC-NK) es un proceso que se puede subdividir en varias etapas. La etapa de activación, que ocurre inmediatamente después de la unión a la célula blanco (3-6 min) es determinante en la acción citolítica. El efecto conjunto de ionóforos de Ca (Io) y ésteres de forbol (TPA), aumenta la CMC-NK y el AMP-cíclico la inhibe, lo que sugiere la participación de proteína quinasas en ambos procesos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la fosforilación in vivo de proteínas durante la etapa de activación.

Se trabajó con fracciones altamente enriquecidas en células NK aisladas por gradientes discontínuas de Percoll, caracterizadas por los marcadores CD16 y CD56 y la citolisis. La fracción celular se incubó en medio RPMI 1640 deficiente en fosfato, suplementado con 200 uCi/ml de 32-P Ac. ortofosfórico en presencia (por 6 min) y ausencia de células K-562 (células blanco). El análisis se efectuó por electroforesis en dos dimensiones y autoradiografía.

Los resultados hasta ahora encontrados, muestran cambios en el patrón de fosforilación de proteínas de las células NK inducidos por la presencia de las células blanco, los que se caracterizan por la aparición de proteínas fosforiladas y la desfosforilación de varias otras fosfoproteínas.

De acuerdo a estos resultados, se puede sugerir la participación de proteína quinasas y fosfatasas en la regulación de la etapa de activación de las células NK.

PROYECTO FONDECYT 90-1115

125

c-rel y relB, TRANSACTIVADORES DE LA EXPRESION GENICA. (c-rel and relB, transactivators of gene expression).

Ryseck, R.P., Bull, P.■, Takamiya, M.■, Errázuriz, C.■, Bours, V.*, Siebenlist, U.*, Dobrzanski, P., y Bravo, R. Dept. of Molecular Biology, Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Princeton, NJ, ■Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, y *Laboratory of Immunoregulation, The National Institutes of Health Bethesda, MD.

Los proto-oncogenes que tienen el dominio rel en su estructura son factores de transcripción e incluyen c-rel de pollo, de humano, de ratón, de Drosophila (en cuyo caso se denomina Dorsal, que cumple un importante rol en el desarrollo embrionario) y los recientemente descritos NF-kB-p50 y NF-kB-p65, que participan en la expresión de las cadenas kappa de la inmunoglobinas, entre otros.

En este trabajo se describe otro gen de esta familia, relB, inducible por suero, que codifica una proteína de 558 aminoácidos. Posee el dominio rel en el amino terminal, mientras que en el carboxilo terminal posee una región activadora de la transcripción, en forma similar a c-rel. Sin embargo, presenta en el extremo amino terminal una región compuesta por leucinas cada 6 aminoácidos, descrita en otras proteínas como un dominio de dimerización, lo cual hace pensar que puede hacer de puente para la interacción con otras proteínas. RelB no se une con alta afinidad a sitios NF-kB, a menos que forme heterodímeros con la proteína NF-kB $-p^{50}$.

Para comprender la manera como relB regularía la expresión de genes que poseen el oligonucleótido NF-kB en su promotor se requerirá de un mayor análisis.

Financiado parcialmente por FONDECYT, proyecto 834-90.

126

CITOPROTECCION POR FLUNARIZINA DE LA CELULA CROMAFIN ADRENAL. (Protection of chromaffin cell by flunarizine).

SANCHO, C., MORO, M.A., GARCIA, A.G. Y CARDENAS, A.M. (Patrocinio : M. Soler) Dpto. Farmacología, Fac. Medicina, U. Autónoma de Madrid, Cátedra de Farmacología, Esc. Medicina, U. de Valparaíso.

Se estudia la acción citoprotectora de flunarizina en células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas incubadas en presencia de veratridina 10 uM. Las subpoblaciones de células cromafines bovinas se aislan según el método descrito por Moro et al. (1990). La veratridina produce la muerte de las células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas, cuando se incuban las células en monocapa en presencia de la toxina durante 24 h, presentando una DL50 de 10 uM. Este efecto letal es Na^+ y Ca^{2+} dependientes e inhibido por tetradotoxina, sugiriendo que la despolarización sostenida por Veratrina ocasiona la apertura de canales de Ca^{+2} voltaje-dependientes, y que es el Ca^{+2} acumulado en las células el causante de su muerte. Por consiguiente, flunarizina, un antagonista del Ca^{+2}, podría prevenir las acciones letales de la veratridina. En efecto, cuando las células se incubaron con Veratridina (10 uM) en presencia de flunarizina (1-30 uM), ésta previno la muerte celular en forma concentración-dependiente. Este efecto citoprotector fue mayor en las células adrenérgicas. La citoprotección de flunarizina no es compartida por boqueantes de canales de Ca^{+2} tipo L (Nimodipina), pudiéndose atribuir el efecto protector de funarizina a sus acción bloqueante de otros subtipos de canales de Ca^{+2}.

127

EFECTO PROTECTOR DE LA MONENSINA SOBRE LA INFECCION POR VIRUS IPN. (Protection of IPNV infection by Monensin).

Soler, M., Vargas, J., Farías, G. y Kuznar, J. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso.

El propósito de nuestra línea de trabajo es contribuir al conocimiento de los mecanismos que permiten la internalización, a la célula hospedadora, de los virus que no poseen una envoltura lipídica externa.

En trabajos anteriores demostramos que el virus de la necrósis pancreática infecciosa, virus IPN, penetra vía compartimentos endosómicos al interior de las células CHSE-214 en cultivo. Asimismo experimentos con NH_4CL y cloroquina sugirieron un requerimiento de bajo pH endosomal para una infección exitosa.

Para establecer una relación más directa entre bajo pH (5.5-6) e infección, estamos, en la práctica, intentando simular, en el exterior de la célula, condiciones similares a las que encuentra el virus en el interior de los endosomas. Para este fin, células tratadas con Monensina, por lo tanto con un pH endosomal relativamente alto, se infectan con virus en condiciones de pH extracelular similares al esperable en un endosoma. Los resultados obtenidos muestran que la Monensina protege a las células de la infección, sin embargo, si el pH extracelular es inferior a 6, el inhibidor no protege a las células. La información obtenida apoya la idea de una vinculación directa entre pH bajo y penetración del virus a través de una membrana lipídica.

PROYECTO 0407 / FONDECYT

128

CARACTERIZACION DE UNA PREPARACION DE NERVIO EN CULTIVO PRIMARIO (Characterization of nerve preparation upon primary culture)

Troncoso V. Unidad de Neurobiología Molecular, Dpto. Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: E.O. Campos).

En un cultivo primario de nervio con su ganglio, se estudió el patrón de proteínas y la incorporación de trazadores al ganglio y su posterior migración hacia el nervio.
Nervios con ganglios lumbares de *Xenopus laevis* fueron montados en cámaras con particiones, que permiten dar pulsos de aminoácidos marcados al ganglio, o a un segmento de nervio alejado del ganglio. La preparción se mantuvo a temperatura ambiente, sin control de gases. A distintos tiempos de sobrevida, se obtuvo muestras de ganglio y nervio para centelleo líquido, electroforesis de proteínas y fluorografía.
El patrón de proteínas de nervio y ganglio no se altera al suprimir la insulina y/o el suero fetal del medio de cultivo hasta 7 días de sobrevida. Al dar un pulso de trazadores al ganglio, se observa una onda radiactiva asociada a proteínas que avanza por el nervio a 1 mm/día. El pulso de trazadores aplicado a un segmento de nervio determina la aparición local de proteínas marcadas, detectadas por técnicas bioquímicas y por radioautografía óptica.
Estos resultados indican que el tejido es viable en las condiciones de cultivo utilizadas y que remeda los procesos "in vivo". Este método ofrece la ventaja de no exigir atmósfera ni temperatura controladas.

Proyecto **FONDECYT 493/89**.

129

DETECCION DE *Vibrio cholerae* MEDIANTE AMPLIFICACION DE DNA. (Detection of *Vibrio cholerae* by DNA amplification)

Vásquez A.*, Salinas A.M.*, Montiel F*, Castillo L.*, Valenzuela M.T.*, Kaltwasser G.*. *Laboratorio de Microbiologia Clinica CEDIUC, Facultad de Medicina. P. Universidad Católica de Chile. * Instituto de Salud Pública de Chile.

En el segundo trimestre del año en curso, en nuestro país se presentó un brote de infección por *V. cholerae* biotipo El Tor/Inaba, diagnósticadose 41 casos mediante metodología clásica de caracterización bioquímica y serológica.
Desarrollamos una metodología de detección de *V. cholerae* mediante amplificación génica de una región del gen de la hemolisina (Hly) de *V. cholerae* de 347 pares de bases (pb). Los iniciadores utilizados son de 20 bases cada uno y corresponden a la secuencia complementaria a las posiciones 3'-5' 202 y 3'-5' 649. Las condiciones de amplificación fueron de 35 ciclos de 93°C por 1 min, 60°C por 2 min, 75°C por 2 min en buffer Taq polimerasa estandar, con Mg^{2+} ajustado a 3mM y 2.5 U de Taq polimerasa. El producto de amplificación se separa en gel de agarosa 2% y se visualizó observandolo en un transiluminador con luz U.V., previa tinción del gel en una solución de bromuro de etidio (Et-Br) 1 µg/ml por 10 min.
Se analizaron 41 cepas de *V. cholerae* aisladas de igual número de pacientes del brote epidémico y 4 cepas de *Vibrio no-cholerae*: *V. alginolyticus* (1), *V. fluvialis* (2) y *V. vulnificus* (1) aisladas de deposiciones y de aguas de regadío.
Se amplificó un fragmento de 347 pb en las 41 cepas de *V. cholerae* cuya secuencia corresponde a la descrita para el gen de la hemolisina. En las cepas de *Vibrio no-cholerae* no se detectó amplificación del segmento señalado.
Se realizaron estudios para establecer la capacidad diagnóstica del método, con este objetose hicieron diluciones de cantidades conocidas de *V. cholerae*, las cuales se filtraron mediante filtros de poros de 0.22 µm. La purificación de DNA de *V. cholerae* se realizó mediante ciclos de congelamiento e incubación a 50°C de los filtros en agua tratada con dietilpirocarbonato al 0.1%, realizando posteriormente la amplificación de DNA.
El procedimiento descrito nos permitió detectar entre 10-100 bacterias en 100 ml.

Financiado Proyecto Fondecyt 0737/91

130

ALTERACIONES EPIDERMICAS EN LARVAS JOVENES DE Bufo arenarum EXPUESTAS A CADMIO EN SOLUCIONES NO IONICAS (Epidermic alterations in Bufo arenarum young tadpoles exposed to cadmium in non-ionic media). Ferrari, L. y Salibián,A. Universidad Nacional de Luján y CIC, Buenos Aires, Argentina.

Las larvas jóvenes de Bufo arenarum toleran 30 días de incubación en agua destilada (ad) y unos 7 días en soluciones iónicas (ClNa) y no iónicas (D-manitol, man) de hasta 141 mOsm. Además existe un efecto protector de los iones para la toxicidad del Cd((II): cantidades subtóxicas del mismo disueltas en medio aiónico (ad) o no iónico (man) reducen la sobrevida de los animales a 12 h o menos.
Analizamos comparativamente las alteraciones de la epidermis de larvas jóvenes (estadio 26) mantenidas a 20°C por 6 h en ad y man de 141 mOsm, y por 24 h en ClNa de igual osmolaridad; los tres medios contenían 1 ppm de Cd. Simultaneamente se corrieron controles sin Cd. Las larvas que al cabo de esos tiempos se hallaban vivas fueron procesadas para su análisis por microscopía electrónica de barrido.
Los controles sin Cd y los de ClNa con Cd mostraron imágenes normales. El metal en ad y man provocó relajamiento de las uniones celulares, desprendimiento y deformación celular y perforaciones a nivel de membrana.
Las alteraciones observadas fueron rápidas, Cd específicas e independientes de la osmolaridad del medio. La interpretación de estos hechos ha de estar vinculada a la competencia del Cd con el Ca(II) que es reconocido como un factor básico en la adhesividad celular.
Los apoyos técnicos de R. Yoshihara y J. Katz y económicos de UNLU y CONICET se agradecen.

131

INTERACCIONES MOLECULARES DE LA PROTEINA TAU DE CELULAS WEHI-3B CON LA DROGA ESTRAMUSTINA. (Molecular interactions of protein Tau from WEHI-3B cells and Estramustine). J.F. Santibañez y J.Martínez. Unidad de Biología Celular, INTA U. de Chile.

Estudios previos han demostrado que Estramustina (Estr), droga antineoplásica que depolimeriza tubulina, se une a una proteína asociada a microtúbulos del tipo Tau presente en el citoesqueleto de células leucémicas de la línea WEHI-3B productora de Interleuquina-3 (IL-3). Como resultado de esta interacción se produce un bloqueo en la secresión de IL-3 estimado por la disminución de la capacidad estimulatoria de medios condicionados por células WEHI previamente tratadas con la droga, sobre la hematopoyesis.

En el presente estudio se caracteriza en términos moleculares la unión de Estr. con la proteína Tau de células WEHI. El grado de interacción se midió evaluando el cambio estructural que experimenta Tau bajo la acción de la droga. Para ello y utilizando un método de ELISA, se midió la exposición del epítope reactivo de Tau que interactúa con el anticuerpo monoclonal sitio-específico MTB6.22 que reconoce el sitio de unión de Tau a tubulina. Como resultado de estos experimentos se aprecia que Estr interfiere con la unión de la proteína con el anticuerpo, lo que podría suponer una unión molecular en dominios estructurales de Tau involucrados en la unión a microtúbulos.

Financiamiento: FONDECYT 91-1067 y 186-90.

132

SECUENCIAS DE CONSENSO EN LOS DOMINIOS C-TERMINALES DE LAS ISOFORMAS DE ß-TUBULINA ESTAN IMPLICADAS EN LAS INTERACCIONES REGULATORIAS DE LAS DIFERENTES MAPs (Consensus sequences of the C-terminal domains of ß-tubulin isoforms are involved in the regulatory interactions of the different MAPs). Vial, C., González, M., Cross, D. and Maccioni, R.B. Dept. Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Centro Internacional del Cáncer y Biología del Desarrollo (ICC).

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que la región C-terminal de tubulina está involucrada en la interacción diferencial de proteínas asociadas MAP-1, MAP-2 y Tau, y que este dominio juega un papel regulatorio en su autoensamblaje para la formación de los microtúbulos. La subestructura de este dominio regulatorio se ha estudiado utilizando enfoques bioquímicos e inmunológicos. Un creciente número de evidencias indica que una secuencia dentro de la región C-terminal conservada de las isoformas de ß-tubulina constituye un sitio común para la unión de MAP-2 y Tau. En esta investigación se muestra la utilidad de anticuerpos monoclonales sitio-específicos para identificar los dominios funcionales para la interacción de las distintas MAPs. A través de estudios de inmunotransferencias, ELISA y análisis del ensamblaje en presencia de estos anticuerpos se concluye que: (a) MAP-2 y Tau se unen al dominio común ß(422-434) de las distintas isoformas de tubulina, interacción productiva en el proceso de autoensamblaje. (b) El segmento DEQG dentro de este dominio es crítico en la interacción. (c) MAP-2 interactúa con un segundo sitio en el dominio ß(435-444), unión no productiva en relación al mecanismo de ensamblaje. (d) MAP-1 interactúa selectivamente con el dominio acídico ß(435-444) en los diferentes isotipos de ß-tubulina. Estos experimentos, junto a estudios sobre la naturaleza estructural de estas MAPs, aportan valiosa información sobre el mecanismo de interacción de tubulina con los diferentes componentes de las MAPs. (Financiado por Conicyt, OTAN y Council for Tobacco Research).

133

CARACTERIZACION DE "LIPOPROTEINAS BILIARES" MODULADORAS DE LA NUCLEACION DEL COLESTEROL (Characterization of "biliary lipoproteins" with cholesterol nucleation influencing activity). Núñez,L.,Miquel,J.F. y Nervi,F. Departamento de Gastroenterología. Pontificia Universidad Católica de Chile.

La nucleación del colesterol biliar(Col) es un evento clave en la patogenia de la colelitiasis. Una fracción significativa del Col excretado hacia la bilis es solubilizado en vesículas unilamelares (lecitina y Col). Bajo ciertas condiciones estas vesículas se agregan y fusionan creando núcleos de precipitación de Col,iniciando el proceso que finalmente da origen a cálculos macroscópicos. Este fenómeno es modulado por distintas proteínas biliares.

Recientemente hemos demostrado por SDS-PAGE la existencia de 6 proteínas (52 a 200 kDa) asociadas especificamente al transportador vesicular de Col en bilis hepática de 12 pacientes litiásicos. Estas proteínas favorecieron la nucleación del Col en bilis artificial y podrían tener un rol fundamental en la patogenia de la colelitiasis. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar estas "lipoproteínas biliares".

Utilizando una columna cromatográfica de afinidad con Concanavalina-A demostramos que 5 de estas proteínas son glicoproteínas con residuos manosa o glucosa. Para evaluar sus propiedades anfipáticas, se utilizó la técnica de separación en fases con detergente no-iónico Tritón-X-114. Las 5 glicoproteínas se recuperaron en la fase detergente y sólo una (52 kDa) en la fase acuosa. Estudios de inmunodetección permiten afirmar que esta proteína es albúmina. En condiciones reductoras fue posible detectar cadenas pesadas de IgA, IgG e IgM. Las glicoproteínas de 114 y 130 kDa no reaccionaron con los anticuerpos estudiados (anti-albúmina, anti-suero total y anti-Ig humanas), sugiriendo que estas glicoproteínas pueden ser específicas de la bilis.

Proyecto Fondecyt 0833/90.

134

EFECTOS AGUDO Y CRONICO DE SIMVASTATIN EN LA COLESTEROGENESIS HEPATICA Y SECRECION BILIAR DE COLESTEROL. (Acute and chronic effects of Simvastatin on hepatic cholesterogenesis and biliary cholesterol output). Amigo,L. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Simvastatin (SV), es una droga inhibidora competitiva de la HMG-CoA reductasa, enzima reguladora de la síntesis de colesterol (Col). La droga, sin embargo aumenta la concentración de Col hepática y la secreción biliar de Col y fosfolípidos en ratas tratadas con SV. El objetivo de este trabajo fue estudiar el mecanismo de la hipersecreción biliar de Col. Estudiamos el efecto agudo y crónico de SV en la síntesis y esterificación de Col "in vivo" e "in vitro". Ratas Wistar macho fueron alimentadas con 20 mg% de SV por 6-12 hrs y 7 días, o se inyectó SV iv 2,5 mg x 100 g peso rata en experimentos agudos.Se estudió la síntesis y esterificación en los hepatocitos aislados,y también la actividad de la enzima microsomal acil-CoA : Colesterol aciltransferasa (ACAT) reguladora de la esterificación del Col.

En los experimentos agudos (6 hrs), la síntesis del Col hepático disminuyó un 63% y la secreción biliar de Col un 33%. Posteriormente (12 hrs), se produce un aumento de la síntesis hepática de un 185% y un incremento de la secreción biliar de Col de 200%. En los experimentos crónicos, se observó un aumento de la secreción biliar de Col de un 260% y en la secreción de Col neosintetizado de un 188%. También aumentó la síntesis hepática de Col en 250%.

En ensayos con hepatocitos aislados incubados con SV,se observó una inhibición de la síntesis de Col y Col -ester proveniente de neosíntesis;en cambio en ratas alimentadas con SV, se observó un aumento en la síntesis de Col y Col ester proveniente de neosíntesis. No se observó cambios en la esterificación de Col en estudios con hepatocitos y microsomas.

Los resultados indican que la hipersecreción biliar de Col, en este modelo experimental, se debe principalmente a un aumento en la síntesis de Col hepático.

FONDECYT 0833/90

135

AISLAMIENTO DE PEROXISOMAS A PARTIR DE MUESTRAS DE HIGADO HUMANO CONGELADO. (Isolation of peroxisomes from frozen human liver samples). Hidalgo, U., Alvarez, A., Kawada, M.E. Depto. Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. (Patrocinio: M.J. Santos)

Los peroxisomas son organelos subcelulares esenciales que participan en vías metabólicas tales como β-oxidación de ácidos grasos, síntesis de plasmalógenos, etc. Su ausencia, determinada por alteraciones genéticas, en su caso más extremo producen la muerte en el hombre. Este hecho determina un gran interés por establecer los mecanismos subyacentes a su biogénesis.

Dada la dificultad que representa el obtener muestras de hígado humano, hemos concentrado nuestro trabajo en evaluar el aislamiento de peroxisomas a partir de biopsias hepáticas congeladas. Utilizamos muestras obtenidas de grandes resecciones quirúrgicas, las que se congelaron y mantuvieron a -70ºC. Los peroxisomas se aislaron por fraccionamiento diferencial e isopícnico. La integridad peroxisomal se analizó por los criterios de latencia enzimática, sedimentabilidad y apariencia morfológica a microscopía electrónica.

Sorprendentemente, nuestros resultados muestran la factibilidad de obtener una proporción significativa de peroxisomas intactos. Por ello, el empleo de muestras de hígado congeladas se presenta como una útil herramienta para la purificación de éstos y otros organelos celulares membranosos.

Financiado por FONDECYT 718/902

136

AUMENTO DE ENZIMAS PEROXISOMALES Y DE UN PEPTIDO DE 64 kDa EN MACROFAGOS DE RATON EN CULTIVO TRATADOS CON CLOFIBRATO (Peroxisomal enzyme and 64 kDa peptide increase in cultured mouse macrophages treated with Clofibrate). Couve, A., Santos, M.J. Dpto. de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Los peroxisomas son organelos subcelulares esenciales que cumplen variadas funciones metabólicas: β-oxidación de ácidos grasos, síntesis de plasmalógenos, etc. En hepatocitos de roedores, los peroxisomas aumentan su número y contenido enzimático, como respuesta a tratamientos con drogas hipolipidemiantes. Es discutible si existe inducción peroxisomal en células no hepáticas. Biogenéticamente, las proteínas peroxisomales se sintetizan en ribosomas libres y son incorporadas al organelo en forma postraduccional. En humanos se han descrito una serie de enfermedades genéticas que afectan la biogénesis peroxisomal.

Con el objeto de encontrar un modelo celular que permita estudiar el ensamble del organelo y los defectos genéticos que afectan a este proceso, comenzamos un estudio de inducción peroxisomal en la línea celular de macrófagos de ratón, J774-3. La incubación de estas células con Clofibrato, una droga hipolipidemiante de efecto conocido, determina un aumento preferencial de enzimas peroxisomales (catalasa y oxidasa de ácidos grasos), y de un péptido de 64 kDa de localización citosólica.

Los resultados obtenidos evidencian la posibilidad de obtener inducción peroxisomal en células no hepáticas en cultivo.

Financiado por Proyecto FONDECYT 718/90.