

V REUNION ANUAL
SOCIEDAD DE BIOLOGIA CELULAR
DE CHILE

La Leonera, Chile
29 y 30 de agosto de 1991

Resúmenes de Comunicaciones
Abstracts of Communications

CONFERENCIA DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGIA CELULAR

MECANISMOS DE REGULACION DE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE CALCIO EN MUSCULO ESQUELETICO. (Intracellular calcium regulation in skeletal muscle). Hidalgo, C. Centro de Estudios Científicos de Santiago y Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La concentración de calcio libre en el citoplasma juega un papel preponderante en la fisiología del músculo esquelético. En reposo, la célula muscular posee una muy baja permeabilidad al calcio, y mantiene niveles citoplasmáticos de calcio libre de 0,1 μM en contra de un considerable gradiente electroquímico (-10.000 Kcal/mol). En efecto, la concentración externa de calcio es de 2 mM, lo que genera un gradiente químico de -4150 Kcal/mol a 25°C, y el potencial de reposo de la célula muscular es de -90 mV, lo que genera un gradiente eléctrico de -5850 Kcal/mol. Como ambos gradientes impulsan la entrada de calcio a la célula, esta se llenaría de calcio en el reposo a pesar de su baja permeabilidad, lo que no ocurre porque existen transportadores en la membrana que remueven el calcio interno a expensas del metabolismo celular.

Las células musculares esqueléticas están innervadas a nivel de la placa motora. Al recibir un estímulo del nervio, la célula muscular responde con una serie de procesos consecutivos que producen un aumento de 10-100 veces en la concentración intracelular de calcio, lo que a su vez gatilla la contracción al permitir la interacción entre los filamentos de actina y miosina. Una vez que cesa el estímulo, se produce la relajación por la acción combinada de transportadores celulares presentes en las membranas externas y en las del retículo sarcoplasmático, que disminuyen el calcio interno a los niveles de reposo.

En el músculo esquelético los túbulos transversales constituyen entre el 80% y el 90% de la superficie total de membranas externas de la célula. Por lo tanto, es posible suponer que ellos juegan un papel central en la mantención del bajo nivel de calcio en reposo. Usando vesículas aisladas de túbulos transversales, hemos caracterizado dos sistemas que transportan calcio hacia el exterior de la célula, una bomba de calcio dependiente de ATP y estimulada por calmodulina, y un intercambiador Na/Ca de naturaleza electrogénica. La bomba tiene una muy alta afinidad por calcio, con un $K_{0.5}$ de 0,3 μM , y una velocidad máxima de transporte de 7 a 10 nmol/mg de proteína por minuto, a 25°C. El intercambiador, a su vez, tiene una menor afinidad por calcio, con un $K_{0.5}$ de 2,7 μM , pero su velocidad máxima de transporte es 5 a 10 veces mayor que la de la bomba.

El retículo sarcoplasmático, a su vez, tiene un papel central tanto en la contracción como en la relajación de la célula muscular, ya que es la apertura de canales de calcio del retículo sarcoplasmático la que permite el aumento de calcio intracelular, y es el transporte de calcio hacia el lumen del mismo el proceso determinante en la relajación. Usando vesículas aisladas de retículo sarcoplasmático, hemos estudiado ambos procesos. El transporte de calcio desde el citoplasma hacia el interior del retículo sarcoplasmático lo lleva cabo una bomba de calcio que es una proteína intrínseca de membrana que requiere una matriz lipídica fluida para operar y que, a diferencia de la bomba de calcio presente en la membrana de los túbulos transversales, no es estimulada por calmodulina. Al disminuir la fluidez de los lípidos que rodean la enzima pudimos demostrar que se inhibe el transporte porque se interfiere con la movilidad rotacional de la proteína, lo que indica que esta bomba realiza movimientos conformacionales durante el proceso de transporte. La velocidad de transporte de la bomba depende de la concentración de calcio; es máxima a $p\text{Ca}=6$ y se inhibe a valores menores o mayores, de tal modo que en el reposo, a $p\text{Ca}=7$, la velocidad de transporte es muy baja. Los valores máximos de velocidad de transporte de la bomba en la membrana nativa fluctúan alrededor de 1200 amol/mg de proteína por minuto, a 25°C y $p\text{Ca}=6$. La liberación de calcio del retículo sarcoplasmático es un proceso muy rápido que puede ser activado por una serie de agonistas tales como ATP, cafeína e IP₃, aunque no se sabe cuál es el mecanismo fisiológico que lo gatilla. En presencia de 5 mM ATP hemos determinado que la velocidad inicial de liberación de calcio en vesículas es 100 veces mayor que la velocidad de transporte de la bomba, como se espera de los flujos a través de un canal con una alta conductancia al calcio.

Estos resultados sugieren que en el reposo la regulación de la concentración interna de calcio de la célula depende principalmente en la bomba de los túbulos transversales, ya que este transportador posee la mayor afinidad por calcio y operaría a $p\text{Ca}=7$. Además, la bomba de los túbulos transversales transporta calcio hacia el medio extracelular, y no hacia un compartimento interno saturable, cual es el retículo sarcoplasmático. El intercambiador y la bomba del retículo sarcoplasmático, que poseen una menor afinidad por calcio pero velocidades de transporte mayores, operarían en condiciones en las cuales ha ocurrido un aumento considerable en la concentración interna de calcio libre, tales como las que suceden después de la liberación causada por la estimulación de la célula.

Financiado por FONDECYT 972, DIB 2149 y NIH GM35981.

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE VISION ARTIFICIAL APLICADO AL RECONOCIMIENTO DE MICRONUCLEOS EN FROTIS DE SANGRE.

(Development of an artificial vision system applied to micronuclei detection)

(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.

Se ha demostrado que la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de peces es una medida adecuada de la contaminación ambiental. Para efectuar un recuento con significación estadística se debe examinar unas 3000 a 5000 células. Hemos utilizado un equipo consistente en un microscopio trinocular, cámara de video, computador personal dotado de hardware y software de adquisición de imágenes para desarrollar un sistema de detección y recuento de micronúcleos en peces.

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 adaptarse a otras especies mediante el uso de un patrón. Financiado por DTI (U de Chile) FONDECYT y la Fundación Andes.

PRELIMINARY OBSERVATION OF NUCLEAR BEHAVIOR IN THE MACTRA(BIVALVIA, MACTRIDAE) EGGS TREATED FOR ARTIFICIAL PARTHENOGENESIS OR GYNOGENESIS.

Wada, K. T. and Komaru, A. National Research Institute of Aquaculture, Nansei Mie 516-01 Japan.

Artificial parthenogenesis or gynogenesis has not been reported in bivalve although there are many reports on successful induction of gynogenesis and its application for aquaculture in fish. Nuclear behavior in the eggs of *Mactra chinensis* was observed with epifluorescence microscopy to obtain basic information for induction of artificial parthenogenesis or gynogenesis for their application to aquaculture.

1) Stripped unfertilized eggs were activated with KCl and treated with cytochalasin B to retain polar body(PB). While all eggs from single treatment of KCl stopped at the stage of one female pronucleus with 2 PB, eggs with one PB from KCl+CB treatments looked to proceed nuclear division but not to cleave. No normal embryo could not be obtained in the latter, suggesting that only retaining maternal factors(PB) are not sufficient for normal parthenogenetic development.

2) Stripped eggs were inseminated with UV irradiated sperm to induce haploid gynogenesis. Fertilization rate decreased as the dosage of UV irradiation increased. Some of male nucleus seemed to expand but did not fuse with female pronucleus at the low UV dosage. At higher dosage some embryos with cilia were obtained at the time when control eggs were trochophore stage.

ESTUDIOS DE PROPIEDADES DIFERENCIADAS EN UNA LINEA CELULAR CLONADA DE MUSCULO ESQUELETICO HUMANO NORMAL. S. Tascón, P. Caviades, J. Hidalgo, E. Jaimovich y R. Caviedes. Depto. De Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Una línea clonada de músculo esquelético humano normal (RCMHN-10) expresa marcadores típicos de músculo (miosina, mioglobina, creatín kinasa tipo MM y desmina). Se analizó la capacidad de fusión de las células in vitro y corrientes iónicas de membrana. Las células se cultivaron en presencia de moduladores externos como forskolina, insulina y transferrina, y 10% suero de caballo. La fusión celular (células con 3 o más núcleos) es un índice de diferenciación y varía entre un 5 y un 80% de acuerdo al tiempo en cultivo y a la presencia de moduladores externos. Las células diferenciadas presentan inmunofluorescencia positiva para distrofina y se aprecian incrementos en la actividad de creatin-fosfoquinasa respecto de controles. Tras 11 días en cultivo con medio suplementado con hormonas (T₃, corticosterona, progesterona, insulina), y utilizando la técnica de patch clamp en célula entera, las células presentan corrientes de entrada activadas por voltaje. El peak de esta corriente es bloqueada en un 30% por tetrodotoxina, indicando la presencia de corrientes de Na⁺. La persistencia de una componente de inactivación muy lenta sugiere la presencia de corrientes de Ca²⁺. Los resultados indican que la línea RCMHN-10 es capaz de expresar características diferenciadas de células musculares.

Financiado por FONDECYT 896, MDA y NIH GM35981-05.

ALGUNOS ASPECTOS DEL TRANSPORTE EPITELIAL DE HIERRO UTILIZANDO CELULAS CACO-2 COMO MODELO EXPERIMENTAL. (Some aspects of iron epithelial transport using Caco-2 cells as an experimental model). Núñez, M.T., Alvarez, X. y Glass, J. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Department of Medicine, Louisiana State University Medical School.

Se estudió el transporte epitelial de hierro utilizando células Caco-2 crecidas en membranas microporosas de policarbonato cubiertas con colágeno en sistemas de cultivo bicameral (Transwell, Costar). Las células crecieron a confluencia, evidenciado por la estabilización de la resistencia transepitelial (TER a un valor de 220 o más ohm/cm^2 y realizaron transporte efectivo de hierro desde el lado apical al lado basolateral. El transporte de hierro ofrecido como Fe^{2+} fue dos veces mayor que el ofrecido como Fe^{3+} . Ascorbato en el lado basolateral incrementó la cantidad de hierro transportado hacia el interior de la célula pero no tuvo efecto en el monto de hierro transportado hacia el lado basolateral. Células con alto contenido de hierro mostraron un bloqueo en su salida hacia el lado basolateral. El transporte tanto de hierro como de ascorbato fue altamente sensible a la TER: el transporte de hierro y ascorbato incrementó exponencialmente a TERs bajo 220 ohm/cm^2 y 150 ohm/cm^2 respectivamente sin aumento de sus niveles celulares, evidenciando transporte paracelular.

Concluimos que las células Caco-2 crecidas en insertos Transwell son un modelo apropiado para estudiar la absorción de hierro. El poder reductor celular, y en particular la presencia de ascorbato en el lado basolateral, incrementa la velocidad de incorporación celular de hierro. El transporte de hierro desde la célula hacia el lado basolateral es regulado negativamente por los niveles celulares de hierro.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1080-91 y por una beca de Período Sabático de la Fundación Andes a M.T. Núñez.

LIBERACION RAPIDA DE CALCIO EN VESICULAS DE RETICULO SARCOPLASMICO AISLADAS DE MUSCULO ESQUELETICO DE ANFIBIO. (Fast calcium release in SR vesicles isolated from amphibian skeletal muscle). Dongo, P., Ronjat, M. e Hidalgo, C. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Centro de Estudios Científicos de Santiago.

El mecanismo fisiológico que produce la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (RS), necesario para la contracción en músculo esquelético es desconocido. Estudios realizados en vesículas de RS aisladas de músculo de conejo, sugieren que la liberación de calcio ocurre por canales presentes en las cisternas terminales del RS, los cuales son activados por calcio en concentraciones micromolares y ATP milimolares e inhibidos por Ca y Mg milimolar.

Con el objeto de estudiar este proceso en el anfibio, hemos aislado una fracción de RS pesado de músculo esquelético de *Caudiverbera caudiverbera* y estudiado sus propiedades de liberación de calcio. Para ello utilizamos una técnica de filtración rápida que permite estudiar flujos de ^{45}Ca en una escala de tiempo de milisegundos. Encontramos que las vesículas son capaces de liberar el 80-90% del calcio acumulado cuando el calcio externo se eleva a concentraciones micromolares en presencia de ATP 5 mM. Determinamos una velocidad máxima de liberación de 2 nanomoles Ca/mg prot/mseg lo que es compatible con la alta velocidad de liberación requerida para producir la activación de los miofilamentos in vivo.

Financiado por grants NIH GM 35981, Fondecyt 972/88, DTI 2149 y Gobierno de Francia.

CONCENTRACION INTRACELULAR DE INOSITOL 1,4,5 TRISFOSFATO (IP3) EN MUSCULO ESQUELETICO DE ANFIBIO. (Intracellular concentration of inositol 1,4,5 trisphosphate in amphibian skeletal muscle). Sánchez, X., Jajmovich, E. e Hidalgo, C. Depto. Fisiología y Biofísica, Fac. Medicina, U. de Chile y Centro de Estudios Científicos de Santiago.

El IP3 ha sido postulado como mensajero químico del acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético. De acuerdo a este modelo, la contracción se produce porque la estimulación eléctrica libera IP3, el que abre canales de calcio del retículo sarcoplasmático, y la relajación se inicia por acción de una IP3-fosfatasa que hidroliza el IP3 liberado. En este trabajo se determinó la concentración de IP3 en extractos crudos de fibras musculares usando un ensayo de radioreceptor (Bredt y cols., Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 976-982, 1989) que permite detectar concentraciones nanomolares de IP3 ($K_{0.5}=10$ nM) en extractos de tejido sin necesidad de mayor purificación y con gran especificidad. Sin embargo, a diferencia de lo descrito, hemos encontrado que tanto PIP2 como ATP poseen la capacidad de desplazar ^3H -IP3 del receptor, aunque con menor afinidad que IP3 ($K_{0.5}=300$ nM para PIP2 y 0.2 mM para ATP), lo que indica que para determinar con precisión la concentración celular de IP3, es necesario determinar primero las posibles contribuciones de PIP2 y de ATP al desplazamiento. Encontramos que en las condiciones de ensayo los niveles de IP3 fluctúan entre 1 a 2 nmoles por gramo de tejido húmedo, y que ni el PIP2 ni el ATP celular contribuyen significativamente al desplazamiento. Financiado por FONDECYT 972, DIB 2149, MDA y NIH GM35981.

ROL DE CALCIO INTRACELULAR EN LA COMPACTACION DE LA MORULA DE RATON. (Role of intracellular calcium on compaction of mouse morula). Pey, R.* e Izquierdo, L. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidades de Chile.

Cuando el embrión de ratón tiene 8 células ocurre el proceso llamado compactación que se observa como un aumento de la superficie de contacto entre las células. Se sabe que la compactación depende de la integridad del citoesqueleto y de calcio extracelular que actúa sobre la glicoproteína de adhesión Uvomorulina.

De nuestros experimentos de cinética de recompactación, inhibición de la compactación con drogas, detección de Uvomorulina por inmunofluorescencia y mediciones de corrientes de calcio, se concluye que la compactación también depende de calcio intracelular.

El calcio intracelular requerido para la compactación ingresa por canales sensibles a Verapamil (0.3 mM en bajo calcio) y parece ser además liberado de depósitos internos (inhibiendo con TMB-8, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Tratamos de mostrar que el calcio intracelular actúa sobre citoesqueleto, via Calmodulina (inhibiendo con TFP 10-20 μM), el que se contraería (experimentos de recompactación) y mantendría regionalizada la Uvomorulina (vista con inmunofluorescencia indirecta).

*becario del Programa de Adiestramiento en Biología de la Reproducción, U. Católica de Chile, Grant RF 88077.

Financiado por DTI y FONDECYT.

CELULAS MUSCULARES ESQUELETICAS DIFERENCIADAS IN VITRO SINTETIZAN Y SECRETAN EL PROTEOGLICAN DECORINA.

(Differentiated skeletal muscle cells synthesize and secrete the proteoglycan decorin) Andrade W. y Branden E. Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Los proteoglicanos (PGs) son componentes de la matriz extracelular (MEC). En la MEC del músculo esquelético de rata se han encontrado a lo menos cuatro PGs sulfatados de distinto tamaño y naturaleza, de los cuales el más abundante es un PG de dermatán sulfato (54%). Nosotros hemos identificado a este último PG como decorina ó DS-PG II. Los niveles de expresión de esta macromolécula, están regulados por el estado de inervación, observándose un incremento en la síntesis de decorina al denervar el músculo esquelético.

Este tejido está compuesto de fibras musculares y varios tipos de células mononucleadas. Se sabe que estas últimas sintetizan y secretan decorina, sin embargo no hay información con respecto a si este PG es producido por fibras musculares. Por técnicas bioquímicas e inmunológicas se observó que miotubos sintetizan y secretan a lo menos tres PGs distintos: Un PG de heparán sulfato de 220-460 Kda., un PG de condroitín/dermatán sulfato de 250-310 kda., y un PG de condroitín/dermatán sulfato de 75-130 Kda.. Este último PG fue inmunoprecipitado específicamente con anticuerpos contra decorina de rata. La síntesis de PGs de secreción durante la diferenciación de células musculares fue evaluada. Se encontraron cambios en las proporciones relativas de algunos PGs. Disminuye el PG de heparán sulfato, hay cambios en la síntesis del PG de condroitín/dermatán sulfato de alto peso molecular, y decorina incrementa su síntesis en forma significativa, especialmente luego de la fusión de los mioblastos. Decorina fue localizada en el interior de las células, alrededor de los núcleos. La expresión diferencial de decorina durante la formación del tejido muscular, sugiere un posible rol para este PG durante este proceso.

Financiado por Fondecyt 569-89.

INCREMENTO DE RECEPTORES DE EGF Y PDGF EN CELULAS DE MUSCULO LISO VASCULAR DE RATAS MILAN HIPERTENSAS. (Increased EGF and PDGF receptors in vascular smooth muscle cells from the Milan Hypertensive rat). Werner E., Salazar G., Canessa M. y González A. 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 de ratas genéticamente hipertensas de la cepa Milan muestran en cultivo primario una mayor tasa de proliferación en respuesta a la incubación con suero comparado con las de la cepa normotensa. El mecanismo de este efecto es desconocido. En este trabajo se analizaron posibles diferencias en sistemas de control mediados por receptores de factores de crecimiento.

Se observó que el factor de crecimiento derivado de epidermal (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) aumentan los niveles de incorporación de ³H-timidina 2 y 5 veces respectivamente, al estimular células musculares hipertensas quiescentes. En cambio, las células normotensas no presentan una respuesta significativa al EGF y responden a PDGF sólo duplicando los niveles basales de incorporación. Estos efectos se correlacionan con un mayor contenido de receptores por célula para ambos factores, que se detectó mediante inmunoblot cuantitativo y en el caso de EGF también por unión de radioligando.

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

c-rel y relB, TRANSACTIVADORES DE LA EXPRESION GENICA. (c-rel and relB, transactivators of gene expression). Ryseck R.P., Bull P.M., Takamiya M.M., Erazuriz C.M., Bours V.Z., Siebenlist U.J., Dobrzanski R., 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-κB-p50 y NF-κB-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-κB, a menos que forme heterodímeros con el oligonucleótido NF-κB.

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

Financiado parcialmente por FONDECYT, proyecto 834-90.

EFFECTO DE SUERO Y MATRIZ EXTRACELULAR EN LA DIFERENCIACION DEL TROFOBLASTO DE RATON. (Effect of serum and extracellular matrix on mouse trophoblast differentiation). Mancilla A.* e Izquierdo L. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Los blastocistos de ratón se "implantan" in vitro cuando se cultivan en un medio con suero; se despojan de la zona pelúcida, adhieren al substrato y el trofoblasto se extiende y poliploidiza. Con el propósito de estudiar los factores involucrados en la diferenciación celular del trofoblasto, hemos comparado la extensión del trofoblasto de embriones cultivados en cápsulas revestidas de substratos de matriz extracelular y no revestidas, en medio de cultivo con o sin suero; estimando además el crecimiento del embrión total por cuantificación de su contenido proteico. Los resultados obtenidos hasta aquí pueden resumirse como sigue: 1. los blastocistos no se "implantan" en ausencia de suero y su trofoblasto no adhiere ni extiende; 2. pero sí lo hacen cuando la cápsula está recubierta de fibronectina o laminina; 3. el efecto es sinérgico, ya que la extensión es mayor si el medio contiene suero y la cápsula está recubierta; 4. en todas las condiciones ensayadas el crecimiento del embrión es semejante. Estos resultados sugieren que el suero contiene elementos de matriz extracelular y/o factores de crecimiento cuyo efecto sería de diferenciación del trofoblasto pero no de crecimiento del embrión.

* Becario CONICYT

Financiado por FONDECYT, Proyecto 91-0838.

LOCALIZACION DE RECEPTORES β_2 -ADRENÉRGICOS EN GLÁNDULAS PAROTÍDAS DE RATÓN. MEDIACION EN LA ACCION DE SECRETAGOGOS (Localization of β_2 -adrenergic receptors in mouse parotid glands. Mediation in the secretagogue activity). González, M.J., Peña y Lillo, S., López Solís, R.D., Alliende, C. y Brañes, C. Dpto. Biología Celular y Genética, Fac. Medicina, U. de Chile.

En glándulas parótidas de ratones adultos, la relación receptores β_1 -adrenérgicos vs receptores β_2 -adrenérgicos es 9 : 1. Los agonistas β_1 -adrenérgicos y los β_2 -adrenérgicos inducen en este tejido una secreción comparable. La administración crónica de ambos tipos de agonistas no altera mayormente la respuesta secretagoga frente a ellos mismos. Sin embargo, isoproterenol (IPR), un agonista β_1 - y β_2 -adrenérgico, provoca desensibilización frente a la acción secretagoga de salbutamol (SAL), un agonista β_2 -adrenérgico. El objetivo del presente estudio fue evaluar por métodos inmunocitoquímicos (anticuerpo policlonal anti-receptor β_2 combinado con reacción peroxidasa-antiperoxidasa) la presencia de receptores β_2 -adrenérgicos en glándulas parótidas normales y estimuladas por IPR.

En glándulas no estimuladas, la inmunoreacción se detectó en dominios de la membrana plasmática de las células acinares en que éstas se contactan con células micropiteliales e intensamente en las células micropiteliales. Una simple administración de IPR o SAL disminuyó la reactividad de superficie en ambos tipos celulares, observándose una marcada endocitosis sólo en las células micropiteliales. El tratamiento crónico con IPR provocó la desaparición total de la reacción. Estos estudios sugieren que a) la estimulación crónica con IPR provoca una pérdida de los receptores β_2 en la glándula parótida y b) receptores β_2 -adrenérgicos localizados en las células micropiteliales pudieran participar en la inducción de la respuesta secretoria de las células acinares.

Proyectos DTI 3208/9013 y FONDECYT 0793/89.

EFFECTO DE ESTIMULACION COLINERGICA EN EL DESARROLLO DE-GLANDULA MAMARIA. (Effect of cholinergic stimulation on mammary gland development). Cabello, G., Vilaxa, A., Quass, A., Valenzuela, M., Durán, V., Lobato, I., Hredic, N. Depto. Biología y Salud y Depto. Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Tarapacá y Hospital Dr. Juan Noé Arica.

Malathion, parathion y eserina, todos inhibidores de la colinesterasa, provocan en glándula mamaria de rata de 21 días de edad, la formación de brotes terminales (TEBs) exageradamente grandes. Cuando se inyecta simultáneamente atropina, estas alteraciones no se presentan. El objetivo de este trabajo fue determinar si la activación de los receptores colinérgicos con pilocarpina provoca alteraciones en el desarrollo de glándula mamaria de rata.

Se inyectó ratas con pilocarpina (10 mg/100g peso corporal/2 veces al día/ 5 días/i.p.). Se anestesió ratas con pentobarbital sódico (8mg/100g peso corporal/i.p.), se extrajeron las glándulas mamarias abdominales, se analizaron completas y en preparaciones histológicas. Se contó el número de TEBs y se midieron con un ocular micro-metrado.

Se encontró que pilocarpina no altera el número de TEBs por mm², sin embargo aumenta su tamaño varias veces. Estos resultados permiten suponer que las alteraciones inducidas por los inhibidores de la colinesterasa, en glándula mamaria de rata se deben a la mayor estimulación colinérgica que provocan.

Proyecto financiado por Fondo de Investigación Universidad de Tarapacá.

PUNTOS DE CONTROL EN G₁ DETERMINADOS POR FOTSENSIBILIZACION DE SECUENCIAS DEL DNA REPLICADAS EN DIFERENTES MOMENTOS DEL PERIODO S₁ EN CELULAS MERISTEMATICAS DE Allium cepa L. (G₁ control point discerned after photosensitizing in meristematic cells). SANS, J.¹; González-Fernández, A.²; Mergudich, D.¹; Aller, P.² y De la Torre, C.².

¹ Dpto. Biol. Cel. y Gen. Fac. Med. U. de Chile.

² Centro de Inv. Biol. C.S.I.C., España.

El inicio de la replicación del DNA en Allium cepa L., depende de la síntesis de proteínas en dos momentos muy discretos del período G₁. Uno en G₁ temprano y otro en G₁ tardío. El objetivo del presente trabajo es determinar los segmentos del genoma que estarían involucrados en el inicio de la replicación del DNA, en células meristemáticas. Con este fin, mediante bromosustitución seguido de irradiación con luz de 300-400 nm en condiciones de anoxia, se investigó el momento en que replican las porciones del genoma involucradas con la regulación de G₁.

El segmento de DNA que replica en el último tercio del período S₁, estaría involucrado en la regulación positiva del inicio de la replicación. Este segmento se expresaría en el G₁ tardío, puesto que la irradiación (efectuada en el medio de esta etapa) de células en que se ha bromosustituido el DNA durante el S₁ tardío, impide el inicio de la replicación. Por otro lado, el segmento de DNA que replica en el primer tercio de S₁ estaría involucrado con el control negativo del inicio de la replicación, ya que en este caso la irradiación adelanta el inicio del período S₁. Sin embargo, la inactivación simultánea de los dos segmentos involucrados en la regulación negativa y positiva de la replicación permite que las células entren en S₁. Finalmente, los segmentos de DNA que replican en la mitad de S₁, no estarían involucrados en la regulación de G₁.

FONDECYT 89-812. Convenio U.de Chile C.S.I.C., España.

EL AGENTE ANTINEOPLASICO ESTRAMUSTINA INHIBE LA SECRECION DE INTERLEUQUINA-3 EN CELULAS LEUCEMICAS. POSIBLE PAPEL DE PROTEINAS ASOCIADAS A MICROTUBULOS. (The anti-neoplastic agent Estramustine inhibits secretion of IL-3 in leukemic cells. Possible role of MAPs.) Santibáñez J.F., Martínez J., Vial C., Fariás G., y Maccioni R.B. INTA y Fac. de Ciencias U de Chile y Centro Internacional del Cáncer y Biología del Desarrollo.

Se describe la inhibición de la secreción de Interleuquina-3 (IL-3) por Estramustina (Estr), droga antineoplásica que interactúa con componentes del citoesqueleto. Este efecto inhibitorio se evaluó midiendo tanto la capacidad de los medios condicionados por células WEHI tratadas con Estr. de estimular la producción de colonias hematopoiéticas provenientes de médula ósea de ratón, como la respuesta proliferativa de la línea celular FDCP-1 dependiente de IL-3. En ambos casos se observó que, en los medios condicionados de células tratadas con Estr. la concentración de IL-3 era menor que en los no tratados con droga. La proteína blanco de la acción de la droga se identificó incubando extractos crudos de células WEHI con ³H Estr. cromatografiando la mezcla en cromatografía zonal. Este procedimiento permitió identificar un pico de radioactividad asociada a proteínas de alto peso molecular. Con esta misma aproximación experimental, pero utilizando proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) purificadas por cromatografía de afinidad, la droga radioactiva se unió en forma específica a una proteína que, por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico, resultó ser una proteína del tipo Tau.

Los resultados presentados sugieren que Estr. ejercería un rol inhibitorio en la secreción de IL-3 por las células WEHI, proceso que comprometería funcionalmente una proteína similar a Tau.

EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO EN SINAPTOSOMAS DE ENCEFALO DE RATA. (Epidermal growth factor receptor in synaptosomes of rat encephalus). Faúndez, V., Krauss, R., Garrido, J. y González, A. Depto. de inmunología Clínica y Reumatología, Fac. de Medicina & Depto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile.

Existen evidencias de que ligandos del receptor de EGF (REGF) se expresarían en el encéfalo. Este receptor es una glicoproteína de membrana de 170 kDa, cuya presencia en tejido nervioso no ha sido claramente demostrada.

En este trabajo se detectó la proteína del REGF de 170 kDa con los siguientes ensayos: a) mediante cromatografía de afinidad utilizando EGF-Affiprep en extractos de cerebro de rata; b) en inmunoblots utilizando anticuerpos anti-REGF purificado de hígado de rata y analizando membranas de sinaptosomas preparados mediante lisis osmótica; y c) en ensayos de "cross-linking" de ¹²⁵I-EGF en sinaptosomas aislados isopínicamente en gradientes de Percoll. Además, estudios de unión del radioligando a estos sinaptosomas y análisis de Scatchard revelan sitios de unión específicos con dos afinidades distintas (K_{d1} : 1.42×10^{-10} M; K_{d2} : 2.5×10^{-9} M). El 17 % de los sitios son de alta afinidad. Estos datos sugieren que el REGF podría tener un rol en la región sináptica.

(Financiado por Proyecto Fondecyt 249/88. F.V. es becario de la Fundación Andes).

MECANISMOS DE INTERACCIÓN DE ESTRAMUSTINA-FOSFATO CON EL SISTEMA DE LOS MICROTUBULOS (Mechanisms of the interaction between estramustine-phosphate with the microtubule system). Moraga, D.^{1,3}, Farías, G.^{2,3}, Rivas, A.³, Wallin, M.⁴ y Maccioni, R.B.^{1,3} ¹Dept. de Biología, Facultad de Ciencias, ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile, ³Centro Internacional del Cáncer y Biología del Desarrollo (ICC) y ⁴Universidad de Göteborg, Suecia.

Estramustina fosfato (Estr.-P), un conjugado fosforilado de estradiol y mostaza no-nitrogenada, inhibe el ensamblaje de microtúbulos e induce la despolimerización de microtúbulos preformados *in vitro*, acción mediada por su unión a MAPs. Se han realizado estudios para caracterizar los dominios funcionales específicos de MAP-2 y tau involucrados en su interacción con Estr.-P. Los resultados más relevantes muestran que: (a) Estr.-P interactúa con MAP-2, tau y con los péptidos sintéticos de secuencias repetitivas de tau: TauI, Val¹⁸⁷-Gly²⁰⁴ y TauII, Val²¹⁸-Gly²³⁵, que definen los sitios de tau para la interacción de tubulina; (b) Este derivado fosforilado de estramustina inhibe la polimerización de microtúbulos inducida por Tau, MAP-2 ó por péptidos sintéticos de tau y (c) Estr.-P inhibe la unión del péptido BII(422-434) de tubulina a MAP-2 y a tau. Se ha demostrado que este fragmento 8-II de tubulina está involucrado en la unión selectiva de estas MAPs a tubulina, y en las interacciones productivas que determinan la formación de microtúbulos. Estos estudios indican que Estr.-P perturba los procesos de ensamblaje-desensamblaje *in vitro* de microtúbulos debido a su interacción con dominios específicos a nivel de las secuencias repetitivas en MAP-2 y tau. (Financiado por The Council for Tobacco Research, USA, y Proy.186/90 de Conicyt).

EFFECTO DE AFIDICOLINA SOBRE PARAMETROS PROLIFERATIVOS DE LAS CELULAS TRANSFORMADAS POR SV40. CAMBIOS EN LA DISTRIBUCION INTRANUCLEAR DEL ANTIGENO T. (Effect of aphidicolin upon proliferative parameters of SV40-transformed cells. Changes in the intranuclear distribution of large T antigen). ORDENES, G.E., PEREZ, I., GINPEL, S., ALVAREZ, P. Y SANTOS, M. Depto. Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Se ha sugerido previamente que el antígeno tumoral mayor (ag-T), que expresan las células transformadas por SV40, podría estar ubicado en los sitios replicativos de tales células cuando están sintetizando su DNA. Para investigar este punto hemos establecido condiciones en que la síntesis de DNA es inhibida reversiblemente, lo que permite correlacionar este proceso con la distribución intranuclear del ag-T. Así, se determinó las condiciones óptimas de tratamiento con afidicolina (inhibidor de la polimerasa alfa) analizando su efecto sobre aspectos del metabolismo celular y parámetros del ciclo proliferativo (duración total del ciclo y de cada una de sus etapas). Además, se determinó la localización intranuclear del ag-T y de los sitios replicativos en relación al bloqueo y desbloqueo de la etapa S. El tratamiento con afidicolina inhibió la síntesis de DNA medida por incorporación de timidina-³H en precipitado ácido insoluble y por índice de marcación con Bromodeoxiuridina (BrdU), detectada inmunocitoquímicamente. También se determinó que 2 h después de eliminada la droga del medio de cultivo se obtenía una recuperación total de la actividad de síntesis de DNA. En términos generales, se produce un acortamiento del tiempo de duración del ciclo celular, que se debería a reducción de las etapas S y G1. En efecto, las células tratadas con afidicolina tienen un periodo S de 4 h mientras que en las células controles éste es de 7 h, lo que sugiere que han quedado bloqueadas más bien en S tardío. Las células tratadas con afidicolina presentan una distribución homogénea del ag-T nuclear, mientras que la reanudación de la síntesis de DNA se correlaciona con un aumento paulatino del porcentaje de células en las que el ag-T adquiere una distribución heterogénea, la que se ha asociado anteriormente con la ubicación de los sitios replicativos. La gran mayoría de estas células presenta una co-localización del ag-T y los sitios de incorporación de BrdU. En consecuencia, y considerando la funcionalidad de ag-T (ej. actividad de helicasa), es probable que esté activamente participando en la replicación del DNA celular. Dado que la expresión de esta proteína viral es constitutiva en las células transformadas por SV40, es probable que constituya uno de los factores que determinan su permanencia en continua proliferación. PROYECTO FONDECYT 1183/90.

RESPUESTA DE MASTOCITOS TESTICULARES A TESTOSTERONA Y DEXAMETASONA EN RATAS TRATADAS CON CLOMIFENO DESDE EL NACIMIENTO. (Testicular mast cell response to testosterone and dexamethasone in clomiphene-early-treated rats). Heyn, R. y Morales, B.A. Depto. Morfología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El testículo presenta escaso n° de mastocitos (MC); sin embargo, éstos aumentan considerablemente en ciertos casos de infertilidad humana. La mastocitosis se ha asociado a bajos niveles de testosterona (T) intratesticulares; por otro lado, los corticoides disminuyen su n° en intestino, piel y músculo. Así, resultó de interés ver la respuesta de los MC ante cambios hormonales que dañen a la gónada.

Un buen modelo se obtiene dando altas dosis del antiestrógeno citrato de clomifeno (CC) a ratas desde el nacimiento hasta los 45ds de edad, logrando una atrofia testicular severa. Posteriormente se forman 3 grupos: CC, CC+T y CC+D (dexametasona), tratados por 21ds más; además, se contó con un Control (suero fisiológico desde el nacimiento). Los testículos se procesaron para MC, y en ellos se determinó densidad de MC y estado de avance de la espermatogénesis (Eg). Tanto peso como tamaño testiculares son menores en los tratados. Con CC y D la Eg se reduce a gonias y Sertoli; al dar T, avanza hasta espermatidas elongadas, y en los Controles es completa. La ausencia de células de Leydig (y T) en el grupo CC favorece un aumento del n° de MC (proliferación o migración) en el intersticio, lo que se revierte parcialmente con T y completa mente con D (en forma similar a los Controles). El uso de D podría ser relevante en la terapia previa a Gn y T de pacientes infértiles que cursen con mastocitosis.

FINANCIA PROYECTO DTI-U.de Chile B-3192-9012.

CARACTERIZACION FUNCIONAL DE UN CLON DE UNA LINEA CELULAR DE GRANULOSA HUMANA (Functional Characterization of a clone from the human granulosa cells line) Ketula C. Luna, L. Reyes J., Romero C., Caviedes R.

Laboratorio de Bioquímica Departamento Obstetricia y Ginecología Hospital Clínico Universidad de Chile Laboratorio de Cultivo de Tejidos Departamento de Fisiología y Biofísica Facultad de Medicina Universidad de Chile

El objetivo de este trabajo fue la caracterización funcional de uno de los clones obtenidos de la línea celular de granulosa humana. Se realizaron experimentos agudos de incubaciones cortas por dos horas a 37°C en ambiente de 95% de O₂ y 5% de CO₂ con agitación constante en presencia de los sustratos adecuados en medio F-12 D. Además se estudio el efecto de LH (1.5 ng/ml)-FSH (0.92 ng/ml) sobre la producción de estradiol encontrando un aumento de 120 pg/ml

Nº Cel	Conc Sustrato	Producción
2 x 10 ⁵	Test 10 ⁻⁶ M	E ₂ 1100 fg/ml
5 x 10 ⁵	Test 10 ⁻⁶ M	E ₂ 3500 fg/ml
9 x 10 ⁵	Test 10 ⁻⁶ M	E ₂ 8200 fg/ml
2 x 10 ⁵	Prog 10 ⁻⁵ M	Prog 911 pg/ml
5 x 10 ⁵	Prog 10 ⁻⁵ M	Prog 1625 pg/ml
9 x 10 ⁵	Prog 10 ⁻⁵ M	Prog 2096 pg/ml

También se estudio la presencia de receptores a FSH y LH mediante el análisis de Scatchard, encontrándose 0.135 fg/cel sitios de unión de FSH y 0.825 fg/cel sitios de unión de LH. Los resultados demuestran que este clon de célula de granulosa humana es capaz de producir estradiol y progesterona en presencia de sus respectivos sustratos, tiene receptores a FSH y LH y por efecto de una mezcla de gonadotropinas se observa un aumento significativo en la producción de estradiol.

OXIDACION DE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) EN RELACION CON SU POTENCIAL ATEROGENICO (LDL oxidation in relation with its atherogenic capacity). Skorin C., Montero E., Solis de Ovando F. y cols. Dep. Biología Celular y Molecular, Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

La lesión aterosclerótica inicial se caracteriza por la presencia de manchas lipóideas formadas por células espumosas; macrófagos derivados de monocitos circulantes cargados de colesterol, derivado principalmente de las lipoproteínas plasmáticas, en particular de las LDL. Los macrófagos se transforman en células espumosas *in vitro*, en presencia de formas oxidadas de LDL y no en presencia de LDL nativa y se ha demostrado presencia de LDL oxidadas en lesiones ateromatosas. La composición de ácidos grasos de la lipoproteína debería afectar la susceptibilidad de éstas a oxidarse y en este contexto ha sido polémico el uso de aceites de pescado enriquecidos en ácidos grasos W3, altamente poliinsaturados, en el tratamiento o prevención de la enfermedad coronaria ateromatosas. Para evaluar el efecto de la oxidación en la composición de las LDL, se oxidó LDL *in vitro* y se determinó ácidos grasos, colesterol, antioxidantes, productos de oxidación, y electronegatividad. Se encontró una caída importante de los antioxidantes liposolubles durante las primeras horas de oxidación correlacionada con un aumento de productos de oxidación y un aumento en la movilidad electroforética, se observó una disminución del contenido de colesterol en el tiempo. Se evaluó también la capacidad de la LDL oxidada de ser degradada por macrófagos peritoneales de ratón, demostrándose un aumento con respecto a la LDL nativa, confirmando lo observado por otros autores. El análisis de la composición de ácidos grasos demostró que los W3; 22:6 y 20:5 se oxidan pero que, curiosamente es el ácido araquidónico, 20:4 W6 el primero en oxidarse. Estos resultados muestran por primera vez el efecto de la oxidación de la LDL sobre los ácidos grasos W3 que la constituyen. (Proy.PNUD CHI/88/017, y Fondecyt 732/91)

EFFECTO DEL ACEITE DE PESCADO SOBRE LAS LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) EN HUMANOS. (Fish oils effects on Human LDL). Miquel A., Feller E., Catalán L., Arteaga A. y cols. Dep. Biología Celular y Molecular, y *Laboratorio de Nutrición, Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

Evidencias experimentales de los últimos años, han demostrado que las lipoproteínas de baja densidad (LDL), son susceptibles de peroxidarse, modificación que las hace aterogénicas: aumenta su incorporación a macrófagos, los que se transforman en células espumosas, características de la lesión aterosclerótica inicial; además se hacen quimiotácticas para monocitos circulantes y citotóxicas. En trabajos previos en humanos, hemos demostrado que la suplementación de la dieta con aceites de pescado enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados w3, se traduce en una incorporación de ellos a fosfolípidos plasmáticos y en una caída dosis dependiente de la capacidad antioxidante del plasma. Potencialmente, ambos efectos podrían determinar una mayor susceptibilidad de las LDL a oxidarse *in vivo*. Para evaluar esto, se suplementó a sujetos con 2 o 4 g/día de w3, o con 8 g/día de w6. Se analizó el eventual cambio en antioxidantes hidro y liposolubles en plasma y lipoproteínas respectivamente; la composición en ácidos grasos de las LDL; y peroxidación reflejada en derivatización de lisinas, por su electronegatividad. Los resultados obtenidos hasta el momento, muestran una marcada incorporación de w3, en especial de EPA, máxima ya con 2g/día de w3. Después de 60 días de suplementación, un 10% de los ácidos grasos de LDL corresponden a w3, inicialmente solo 4%. Esta incorporación de w3 no se acompaña de evidencias de peroxidación en las LDL, estudiadas mediante análisis electroforético y medición de los niveles de antioxidantes. Los resultados sugieren que el enriquecimiento de las LDL en ácidos grasos w3 no se traduce en daño oxidativo y, en consecuencia, no modificaría su capacidad aterogénica. Financiado por Fondecyt 732/91 y PNUD CHI/88/017

PURIFICACION DE LA CARNITINA OCTANOILTRANSFERASA (COT) DE HIGADO DE RATA. CARACTERIZACION DE SU INHIBICION POR 2-TETRADECILGLICIDIL-CoA (TDGA-CoA). (Purification of rat liver COT. Characterization of its inhibition by TDGA-CoA.) Rojas, S., Necochea, C. y cols. Dep. de Biología Celular y Molecular, Universidad Católica de Chile, casilla 114-D, Santiago, Chile. (Patrocinio: F. Leighton).

La β-oxidación de ácidos grasos se lleva a cabo en mitocondrias y peroxisomas. En mitocondrias la carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I) regula la β-oxidación de ácidos grasos de cadena larga a través de su inhibición por malonil-CoA. Sin embargo, no se conocen aún mecanismos regulatorios de la β-oxidación peroxisomal distintos de la disponibilidad de sustrato. En experimentos realizados en hepatocitos aislados, en presencia de TDGA, un inactivador, supuestamente específico de la CPT-1, se encontró una marcada disminución de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga y un aumento de la oxidación peroxisomal a partir de ácidos grasos de cadena mediana y larga. Al medir la actividad de las transferasas en peroxisomas y mitocondrias aisladas de hepatocitos incubados con TDGA, se encontró que aparentemente la COT se inhibe un 51% en presencia del inhibidor. Para caracterizar la aparente interacción entre COT y TDGA se purificó la enzima a partir de una fracción sobrenadante de alta velocidad, de hígado de rata tratada con ciprofibrato; se sintetizó TDGA-CoA (sustrato activo) y se caracterizó su efecto sobre la COT. Se demostró que la inhibición de la COT es del tipo irreversible, presentando la enzima una alta afinidad por el TDGA-CoA. Estos resultados, junto al efecto observado de TDGA en hepatocitos aislados y al hecho que malonil-CoA también inhibiría la COT, permiten proponer un papel regulador para la enzima, a nivel de la exportación al citosol de derivados acil-CoA de cadena mediana producidos por la β-oxidación peroxisomal. (Financiado por Juvenile Diabetes Foundation Int. y FONDECYT 717/90).

CAMBIOS EN PLASMALOGENOS POR LA ADMINISTRACION A RATAS DE ACIDOS GRASOS OMEGA-3 Y BEZAFIBRATO, DOS INDUCTORES DE PROLIFERACION PEROXISOMAL. (Changes in plasmalogens after administration to rats of omega-3 fatty acids and bezafibrate, two peroxisome inducers) Viviana Guasch, Cecilia Barriga, Federico Leighton y cols. Dep. Biología Celular y Molecular, Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

El plasmalógeno de etanolamina (1-(alc-1-enil)-2 acyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) es un glicerofosfo-lípido con una cadena vinil éter en posición sn-1. Parte de la biosíntesis de los plasmalógenos es exclusivamente peroxisomal. Como las dietas ricas en ácidos grasos omega 3 y la administración de bezafibrato aumentan en ratas la actividad peroxisomal, se estudió el contenido tisular de plasmalógenos. Y porque los ácidos grasos omega 3 se acumulan preferencialmente en el plasmalógeno de fosfatidiletanolamina, se estudió su composición. Se utilizó ratas alimentadas con 18% de aceite en la dieta y razones w-3/w-6=5 u w-3/w-6=0, con y sin bezafibrato. Se analizaron los fosfolípidos de cerebro, corazón, hígado, riñón y glóbulo rojo, midiendo el dimetilacetil generado por metanolisis ácida de la cadena sn-1 vinil éter. En cerebro y glóbulo rojo se analizó la composición de ácidos grasos del plasmalógeno de fosfatidiletanolamina, usando secuencialmente fosfolipasa C, TLC, metanolisis ácida y GLC. Los resultados mostraron aumento de 5 veces en el contenido de plasmalógenos en glóbulos rojos de las ratas tratadas con w-3/w-6=5, con y sin bezafibrato. El bezafibrato *per se* produjo un aumento pequeño, pero significativo. Del resto de los tejidos, sólo en riñón se observó un aumento significativo. La respuesta selectiva podría relacionarse con las tasas de recambio de fosfolípidos tisulares. Estos estudios apuntan a comprender el significado biológico de los plasmalógenos, no establecido hasta ahora, y los mecanismos de acción de los ácidos grasos omega 3. (Financiado por PNUD CHI/88/017 y FONDECYT 732/91)

DETERMINACION DEL MOMENTO EN QUE REPLICA EL DNA NOR DESPUES DE TRATAMIENTOS CON 5-AZACITIDINA (5-Aza C) DURANTE SEGMENTOS RESTRINGIDOS DEL PERIODO S. (Determination of the replication time of NOR DNA after 5-AzaC feeding during restricted segments of the S period). MERGUDICH, D.; Leyton, C.; González-Fernández, A.²; De la Torre, C.² y Sans, J.¹.

¹ Dpto. Biol. Cel y Gen. Fac. Med. U. de Chile.

² Centro de Inv. Biol. C.S.I.C., España.

Los cistrones ribosomales de plantas, poseen río arriba del promotor secuencias repetidas cuyo nivel de metilación condiciona su eficiencia transcritiva. En estudios previos hemos visto que tratamientos con 5-AzaC durante todo el S, adelanta la nucleogénesis, proceso que corresponde al ensamblaje del nucléolo y que depende de la reiniciación de la transcripción de los cistrones ribosomales.

En el presente trabajo, se estudia por una parte, cómo cambia el patrón de metilación del DNA después de 5-AzaC y la cinética de síntesis de RNA. Y por otra, el momento en que replican los cistrones ribosomales durante el período S. En este último caso aplicamos un protocolo experimental en que se administra 5-AzaC en cinco segmentos discretos del período S y se analiza la cinética de reorganización nucleolar en la transición M-G₁.

5-AzaC (10⁻⁶M) deprime la incorporación de grupos metilo a regiones ricas en GC. Aproximadamente el 22% de los residuos de metilcitosina son demetilados. Este tratamiento incrementa 1.8 veces la incorporación de ³H Urd.

La hipometilación de distintos segmentos del DNA durante el período S, sugiere que los cistrones ribosomales replicarían en el 2º quinto del período S.

Tratamientos secuenciales con timidina ³H confirman que las zonas organizadoras de nucléolos de los cromosomas replican en S temprano.

FONDECYT 89-812. Convenio U. de Chile C.S.I.C. España.

INDUCCION DE SIALOGLICOPROTEINAS DE SECRECION EN GLANDULA PAROTIDA DE RATON POR TRATAMIENTO CRONICO CON ISOPROTERENOL (Induction of sialoglycoproteins in mouse parotid glands by chronic administration of isoproterenol). M.C. Bráños, M.J. González y R.O. Lopez Solis. Dpto. Biol. Cel. y Gen., Fac. Medicina, U. de Chile.

El tratamiento crónico diario con isoproterenol (IPR) produce crecimiento hipertrofico, inducción de una familia de 5 polipéptidos secretables (pps C-G) e incremento en el contenido de ácido siálico aparentemente secretable también, en las glándulas parótidas de ratón. En el presente estudio se buscó establecer si los pps C-G son las sialoglicoproteínas de secreción. Con este fin, se preparó fracciones solubles (centrifugación diferencial) de parótidas hipertrofiadas, las que fueron sometidas a separaciones electroforéticas en geles de poliacrilamida-SDS y teñidas secuencialmente con PAS y Coomassie blue (Cb).

Un grupo de 5 bandas fueron PAS positivas (Mr 69K, 64K, 55K, 52K y 34K) y algunas de ellas (Mr 64K y 52K) comigraron con bandas Cb positivas correspondientes a los pps C y E. Por fraccionamiento con sulfato de amonio (0-4°C) se obtuvo una fracción (0-30%) rica en los pps D-G y pobre en NANA y otra (30-50%) rica en NANA y carente de los pps C-G. Esta última fracción mostró una marcada reactividad PAS en las bandas electroforéticas Mr 69K, 64K y 55K, distinguibles de los pps C-G. La destilación de las putativas sialoglicoproteínas con neuraminidasa exógena suprimió la reactividad PAS y, en cambio, permitió la reactividad a Cb. La aparición e incremento progresivo de bandas PAS positivas Mr 69K, 64K, 55K y 52K y su desaparición en las 2 horas siguientes a la inducción de secreción pudo ser observada en homogenizados totales. Nuestros estudios sugieren que los pps C-G son escasamente sialilados y que IPR induce al menos 4 sialoglicoproteínas secretorias (Mr 69K, 64K, 55K y 52K).
Proyectos DTI 3208/9013 y FONDECYT 0793/89

INDUCCION DE ENZIMAS PEROXISOMALES EN MACROFAGOS DE RATON EN CULTIVO (Peroxisomal enzyme induction in mouse macrophages in culture). Couye, 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 ácidos biliares y plasmalógenos, etc. Biogenéticamente, las proteínas peroxisomales se sintetizan en ribosomas libres y son incorporadas al organelo postraduccionalmente. En humanos se han descrito una serie de enfermedades genéticas que afectan la biogénesis peroxisomal. En hepatocitos de roedores, los peroxisomas aumentan su número y contenido enzimático, como respuesta a tratamientos con drogas hipolipidémicas. Es discutible si existe inducción peroxisomal en células no hepáticas.

Con el objeto de encontrar un modelo celular que permita estudiar el ensamble del organelo y los defectos genéticos que afectan a este proceso, hemos iniciado el estudio de la inducción peroxisomal en macrófagos de ratón en cultivo. Hemos utilizado la línea celular de macrófagos murinos, J774-3, que se ha cultivado en presencia de Clofibrato, una droga hipolipidémica de efecto conocido. Hemos detectado un aumento preferencial de las enzimas peroxisomales (catalasa y oxidasa de ácidos grasos), dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de la droga utilizada.

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

Financiado por Proyecto FONDECYT 718/90.

LA CELULA GERMINAL PRIMORDIAL HUMANA: ANALISIS DE ALGUNOS DETALLES CITOLOGICOS ASOCIADOS A LA MIGRACION CELULAR. (The Human Primordial Germ Cell: Analysis of some cytological details associated to cell migration).

Pereda, J.; Pozo, J.; Soto, M.; Dabiké, M. Laboratorio Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica.

Adhesión, reconocimiento y cambios de la forma celular son algunos de los cambios involucrados en la migración. Esto implica la presencia de receptores específicos a nivel de la superficie y de un citoesqueleto organizado. El objetivo de este estudio preliminar es describir, durante la fase migratoria de las células germinales primordiales (CGPs), detalles estructurales de la superficie y cortex celular.

Tres embriones humanos de 27, 30 y 33 días de gestación recuperados desde embarazos tubarios después de salpingectomías, se trataron según técnicas convencionales para Microscopía Electrónica de Transmisión.

Las CGPs en migración se reconocen por su gran tamaño, forma redondeada u ovalada, núcleo vesiculoso y nucléolo prominente. En el citoplasma se observa abundante glicógeno y gotas lipídicas. Su superficie celular presenta un glicocalix de 30nm de grosor localizado aparentemente en el polo migratorio. En las CGPs íntimamente asociadas a células somáticas, este glicocalix está ausente. El cortex celular de un grosor de 90 a 100nm, aparece constituido por un retículo que contiene microtúbulos y filamentos finos de dos diámetros diferentes.

Estos resultados son de importancia en relación a los factores que controlan la adhesión y migración de las CGPs hacia la cresta genital.

Financiado por Proyecto DTI M3189-9013

DEPRIVACION DE IL-3 EN CELULAS HEMATOPOYETICAS -IL-3 DEPENDIENTE ALTERA SU UNION A ESTROMA POR INICIO DE APOPTOSIS. (Cell binding and apoptosis in hemopoietic cells). Minguell, J.J., Biología Celular, INTA. U.de Chile y VAMC, Univ. of MS Med. Ctr., Jackson MS. USA.

Interacciones adhesivas entre la célula troncal hematopoyética y el estroma son instrumentales en proliferación, migración y diferenciación en la médula ósea. Puesto que la célula troncal, es factor de crecimiento (FC) dependiente, resulta importante estudiar si los FC afectan los procesos adhesivos. La privación de FC en particular es importante, puesto que durante el trasplante de médula, la célula troncal es manipulada en ausencia de FC. Para estos estudios se utilizan cocultivos de líneas celulares - factor dependiente de progenitores hematopoyéticos y de estroma. Células IL-3(+) exhibieron una adhesión de 52% sobre 20 hrs de cocultivo, en cambio en células IL-3(-) la adhesión bajó a 34%. La readición de FC, dentro de las 10 primeras horas de privación, resulta en la recuperación de la capacidad adhesiva. Este efecto sólo fue producido por IL-3 y IL-4. Células IL-3(-), a pesar de exhibir alta viabilidad (95%), expresaron características moleculares y morfológicas propias de los procesos de muerte celular programada. Sobre 6 hrs de privación de FC, el esquema electroforético de DNA (2% Agarosa) mostró fragmentación con bandas de aprox. 200 pb. y la morfología a ME reveló abundante condensación de cromatina y desaparición de microvellosidades. Estos parámetros, propios de apoptosis no resultaron evidentes en células IL-3(-) a los que se les readicionó el FC dentro de las 10 hrs de privación. Estas observaciones sugieren que los cambios adhesivos que ocurren en progenitores hematopoyéticos-FC dependientes mantenidos en ausencia temporal de FC, son consecuencia del inicio de la expresión de un programa de muerte celular. Fondecyt 89-990.

PROTEINAS DE MEMBRANA PEROXISOMAL HUMANA. (Human peroxisomal membrane proteins.) Alvarez, A., Hidalgo, V., Kawada, M.E., Santos, M.J. Dpto. de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Los peroxisomas son organelos subcelulares esenciales. Sus proteínas son sintetizadas en ribosomas libres y son importadas postraduccionalmente al organelo. El conocimiento de las propiedades de la membrana peroxisomal es crucial para el entendimiento de las funciones del organelo y su biogénesis. En humanos, este conocimiento cobra mayor relevancia, dado la existencia de afecciones genéticas que afectan el ensamblaje del organelo.

Hemos comenzado el estudio de las proteínas de membrana peroxisomal humana, a partir de peroxisomas provenientes de biopsias quirúrgicas de hígado humano, purificados en gradientes de densidad. Hemos obtenido membranas de peroxisomas, mitocondrias y microsomas, mediante distintos procedimientos. Las principales proteínas de la membrana peroxisomal humana tienen pesos moleculares aparentes de 139, 78, 68, 52, 44, 40, 27, y 21 kDa. Las proteínas de 139, 78, 68, 44 y 21 kDa, corresponden a proteínas integrales de membrana. Hemos además producido anticuerpos policlonales que reconocen principalmente las proteínas de 68 y 44 kDa (reconociendo además las proteínas de 139 y 21 kDa) y anticuerpos monoclonales que reconocen las proteínas de 139 y 68 kDa.

Estos resultados aportan herramientas para la caracterización de estas proteínas en situaciones normales y patológicas. Financiado por Proyecto FONDECYT 718/90.

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE CROMATINA EN ESTADOS DE ACTIVA PROLIFERACION. (Chromatin structural study in stages of active proliferation). Gutiérrez, S., Montecino, M., Gamboa, S., Puchi, M., Imschenetzky, M. Depto. Biología Molecular, Fac. Ciencias Biológicas y Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

Uno de los aspectos más estudiados en el proceso de remodelación de la estructura de la cromatina, lo constituye la modificación post-traduccionales de proteínas cromosomales, en especial la ADP-ribosilación.

En un estado de activa proliferación como los primeros ciclos de división del desarrollo embrionario del erizo de mar *Tetrapygus niger*, se ha descrito una poli ADP-ribosilación ciclo celular dependiente de variantes históricas tipo Cs, que alcanza su grado máximo al inicio de fase S y el mínimo al inicio de mitosis. Además, se ha establecido una relación directa de esta modificación con la replicación del ADN y la división celular de estos embriones.

En este trabajo se verificó la importancia de la actividad de poli ADP-ribosilación en la remodelación de la estructura cromatínica replicativa. El análisis se llevó a cabo mediante una digestión con nucleasa micrococcal de núcleos de embriones en fase replicativa (S1) control e incubados con 3-aminobenzamida 20 mM, un inhibidor específico de esta actividad in vivo. Posteriormente, las partículas supranucleosomales y los fragmentos de ADN que las conforman, fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa y poliactilamida respectivamente.

Los resultados obtenidos indican que la cromatina replicativa, presenta una conformación más relajada que la observada en oocitos sin fecundar, con múltiples sitios sensibles a la actividad de nucleasa. Además la incubación con 3-AB induce la obtención de un patrón de digestión similar al observado en cigotos de 5 minutos post-inseminación, en los cuales no se ha producido la remodelación de los pronúcleos masculino y femenino.

Financiado por Proyecto DIC 203135 y 91-31-39-1, Universidad de Concepción.