

**REUNION  
ANUAL CONJUNTA**

**SOCIEDAD  
DE BIOLOGIA CELULAR  
DE CHILE**

**SOCIEDAD  
DE BIOQUIMICA Y  
BIOLOGIA MOLECULAR  
DE CHILE**

**ALGARROBO - CHILE**

**27 al 30 de Septiembre de 1995**

**AUSPICIAN:**

**FUNDACION PARA LA BIOLOGIA CELULAR**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P.UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE**

**BIOCRONOGEN LTDA.**

**BIOS - CHILE I.G.S.A.**

**COASIN  
INSTRUMENTACION Y CONTROL**

**IVENS Y CIA. LTDA.**

*2336014 Depto. Lab. Sergio Alarcón*

**PARRAGUEZ Y TAHA**

**SOCIEDAD COMERCIAL FERMELO LTDA.**

**SOPROLE**

# **REUNION ANUAL CONJUNTA**

**IX Reunión Anual de la  
SOCIEDAD  
DE BIOLOGIA CELULAR  
DE CHILE**

**XVIII Reunión Anual de la  
SOCIEDAD  
DE BIOQUIMICA Y  
BIOLOGIA MOLECULAR  
DE CHILE**

**ALGARROBO - CHILE**

**27 al 30 de Septiembre de 1995**



# BIOCRONOGEN LIMITADA

ORLANDO MORALES BECERRA

Art. para Laboratorio, Médicos y Reactivos

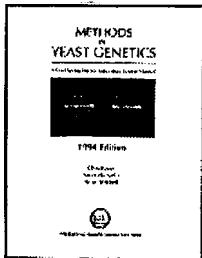
Santa Inés # 1870 - Casilla 23 Correo 47 La Florida

FONO/FAX: 287 3802



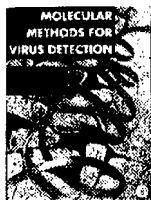
**Biotechnology/Carbohydrates**

**Immunology**



**Biotechnology/Molecular Biology**

**Pesticides/Toxicology**



**Computer Techniques**

**Electrophoresis**



# SIGMA<sup>®</sup>

CHEMICAL COMPANY

P.O. BOX 14908, ST. LOUIS, MO 63178 USA

# PROGRAMA REUNION ANUAL CONJUNTA SOCIEDAD DE BIOLOGA CELULAR Y SOCIEDAD DE BIOQUIMICA Y BIOLOGA MOLECULAR

**Miércoles 27 de septiembre**

13:00 Almuerzo

15:00 COMUNICACIONES LIBRES I (Sala A)

Presidente: Enrique Brandan  
Secretario: Javier Puente

- 15:00 HISTONAS DEL PLATELMINTO *Echinococcus granulosus*. **Galindo, M.**, Galanti, N., Laboratorio de Biología Molecular. Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. EB
- ~~15:15 LOCALIZACIÓN PERINUCLEAR DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA. **Sáez, D.**, Figueroa, C., Slebe, J.C., Instituto de Bioquímica e Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile.~~
- 15:30 LA EXPRESIÓN DE DECORINA SE ENCUENTRA FUERTEMENTE DISMINUÍDA EN FIBROBLASTOS PROVE-  
NIENTES DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. **Brandan, E.**, Melo, F., García, M. A., Contreras,  
M. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. JP
- 15:45 FACTORES SOLUBLES SECRETADOS POR CÉLULAS DE PRÓSTATA BLOQUEAN LA DIFERENCIACIÓN DE  
OSTEOBLASTOS EN CULTIVO. **Silva, S.**, Santibáñez, J. F., Martínez, J. Unidad de Biología Celular, INTA,  
Universidad de Chile. JP
- 16:00 CAMBIOS ESTRUCTURALES EN CÉLULAS OXINTICOPÉPTICAS DE *Aplodactylus punctatus* DURANTE LA  
SECRECIÓN DE ÁCIDO. Freire, M., Cabello, A., Gálvez, M., Ormazabal, A., Messen, L., **Garrido, J.** Departamento  
de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. EB
- 16:15 ESTUDIOS DE LAS UNIONES EN HENDIDURA DE ASTROCITOS DURANTE LA REOXIGENACIÓN  
POSTHIPOXIA. **Martínez, A.**, Sáez, J.C. Depto. de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas P.  
Universidad Católica de Chile. EB
- 16:30 PARTICIPACIÓN DE SINDECAN-1 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES C2C12.  
**Larraín, J.**, Brandan, E. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P.  
Universidad Católica de Chile. JP
- 16:45 CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS NK MEDIADOS POR BACTERIAS. **Miranda, D.**, Puente, J.  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de  
Chile. EB
- 17:00 Café

foro de IP3?  
in act. miranda

17:30 COMUNICACIONES LIBRES II (Sala A)

Presidente: Roberto Mayor  
Secretario: M. Julieta González

- 17:30 ACCIÓN SINERGISTA DE EGF SOBRE LA SÍNTESIS DE DNA EN PARÓTIDA DE RATÓN INDUCIDA POR AGONISTAS B-ADRENÉRGICOS. **González B., M.J., Faéndez, V., González, A., López, R., Alliende, C.** Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Depto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Facultad de Medicina, P. Universidad Católica de Chile.
- 17:45 INDUCCIÓN DE LOS PLIEGUES NEURALES EN *Xenopus*: UN MODELO CELULAR Y MOLECULAR. **Mayor, R., Mancilla, A., Guerrero, N., Martínez, C.** Laboratorio de Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 18:00 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE EGF VIA AMPc. **Werner, E., Bravo, M., González, A.** Depto. Inmunología Clínica y Reumatología, Fac. Medicina y Depto Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile.
- 18:15 INSULINA ESTIMULA LA FOSFORILACIÓN DE TIROSINA Y SERINA DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO HUMANO. **Manríquez, E., Ortolani, D., Rosenmann, E., Canessa, M.** Depto. Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 18:30 UNIONES EN HENDIDURA EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE MICROCIRCULACIÓN DE CEREBRO: CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN POR BRADICININA Y ENDOTOXINA. **Brañes, M.C., Sáez, J.C.** Depto. de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile.
- 18:45 REGULACIÓN DE COLINESTERASAS, PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE Y FRAGMENTOS AMILOIDOGENICOS POR LAMININA Y EL GRADO DE PROLIFERACIÓN CELULAR. **Bronfman, F.C., Inestrosa, N.C.,** Depto. de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile.

17:30 COMUNICACIONES LIBRES III (Sala B)

Presidente: Carlos Jerez  
Secretario: Jaime Eyzaguirre

- 17:30 MUTACIÓN SITIO-ESPECÍFICA EN AMINOÁCIDOS ESCOGIDOS DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRÉVICA DE *Saccharomyces cerevisiae*. **Krautwurst, H., Cardemil, E.** Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile.
- 17:45 CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN IN VITRO DE UN GEN DE *Leptospirillum ferrooxidans* QUE CODIFICA UN PROBABLE RECEPTOR QUIMIOTÁCTICO. **Delgado, M., Toledo, H., Jerez, C. A.** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 18:00: DUPLICACIÓN DEL DNA EN TERRITORIOS CELULARES DEL PROTOSCOLOCE DE *Echinococcus granulosus*. **Galindo, M., Galanti, N.** Laboratorio de Biología Molecular. Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, U. de Chile.
- 18:15 CLONAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DEL CDNA DE UNA ENDOXILANASA DEL HONGO *Penicillium pupurogenum*. **Díaz, R., Peirano, A., Steiner, J., Eyzaguirre, J.** Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, y Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- 18:30 IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE HISTIDINA REACTIVOS EN LAS CARBOXIQUINASAS FOSFOENOLPIRÉVICAS (PEPCKS) DE *E. coli* y *S. cerevisiae* **Montecinos, L., Bazaes, S., Godoy, N., Cardemil, E., Jabalquinto, A.M.** Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile y Departamento de Química, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.

- 18:45 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PEROXIDASAS DE PARED CELULAR DE COLEÓPTILOS DE *Avena sativa*  
L. **González, L.F.**, Rojas, M.C., Pérez, F., Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 19:30 **CONFERENCIA (SALA A)**
- NUEVAS SEÑALES PARA CONOCIDOS MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN EN *Trypanosoma cruzi* **Flawiá M.M.** Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI), Universidad de Buenos Aires.
- 21:00 **Comida**

## Jueves 28 de septiembre

### 9:00 **SIMPOSIO Receptores y Transducción de Señales (SALA A)**

Coordinador: Alfonso González

- 9:00 NUEVAS FORMAS DE REGULACIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO EN CÉLULAS DIFERENCIADAS. Faúndez, V., Werner, E. y **González, A.** Depto de Inmunología Clínica y Reumatología, Facultad de Medicina, y Depto de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 9:30 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G Y ESTIMULACIÓN DE LA VÍA DE QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS. RECEPTOR MUSCARÍNICO DE OOCITO DE *Xenopus laevis*: UN EJEMPLO. Herrera, L. y **Olate, J.** Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- 10:00 REGULACIÓN DE LA EXOCITOSIS EN CÉLULAS CEBADAS POR PROTEÍNAS QUE LIGAN GTP Y CA<sup>2+</sup> **Oberhauser, A. F.** y Fernández, J. M. Centro de Estudios Científicos de Santiago, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, y Mayo Clinic, Rochester, MN, E.E.U.U.
- 10:30 PROLIFERADORES PEROXISOMALES Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES. **Bronfman, M.**, Ponce, C., Burzio, V., Dabike, M e Hidalgo, P. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 11:00 **Café**
- 11:30 **COMUNICACIONES LIBRES IV (SALA A)**
- Presidente: Antonio Morello  
Secretario: Loreto Holuigue
- 11:30 PARTICIPACIÓN DEL CALCIO EN LA RESPUESTA DE DEFENSA DE *Citrus limon* A LA INOCULACIÓN CON *Alternaria alternata*. **Castañeda, P.**, Pérez, L.M., Departamento Bioquímica y Biología Molecular Facultad. Ciencias Químicas y. Farmacéuticas, Universidad de Chile y Depto. Biología, Facultad de Ciencias. UMCE.
- 11:45 CONSTRUCCIÓN DE UN GEN DE CECROPINA, UN PÉPTIDO BACTERICIDA DE INSECTO Y SU EXPRESIÓN EN *Escherichia coli.* **Cáceres, S.**, Gómez, I., Venegas, A., Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

- 12:00 ANÁLISIS MOLECULAR DE GENES DE LA FENILALANINA AMONIO LIASA EN *Citrus*. **Seelenfreund, D.**, Navarro, J., Luxoro, C., Lobos, S., Cifuentes, V., Pérez, L.M. Departamento Bioquímica y Biología Molecular Facultad. Ciencias Químicas y. Farmacéuticas, Depto. Biología Celular. y Genética, Facultad Medicina, Depto. Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 12:15 EFECTOS DE LAS DROGAS NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL SOBRE LOS NIVELES DE LOS TIOLES REDUCIDOS GLUTATIÓN Y TRIPANOTIÓN EN *Trypanosoma. cruzi*. Repetto, Y., Opazo, E., Maya, J.D., **Morello, A.**, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 12:30 ACTIVIDAD ECTO-ATP DIFOSFOHIDROLÁSICA EN PLACENTA HUMANA. **Valenzuela M.A.**, Ketlun A.M., García L., Acevedo C.G., Bravo I., Espinoza V., Collados L., Mancilla M., Chayet L., Traverso-Cori A. Depto. de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
- 12:45 **Almuerzo**
- 14:30 **AVANCES DE TESIS (SALA A)**
- Presidente: Cecilia Hidalgo  
Secretario: Alfonso González
- 14:30 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DEL PLEGAMIENTO Y DESPLEGAMIENTO DEL HETERODÍMERO DE TUBULINA. **Rodríguez, P.** y Monasterio, O. Depto. de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 15:00 MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN OSCILATORIA DE CALCIO DESDE RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO INDUCIDA POR CAFEÍNA. **Pérez, C.F.**, Marengo, J.J., Bull, R. e Hidalgo, C. Depto. Fisiología y Biofísica, Fac. Medicina, Universidad de Chile y C.E.C.S.
- 15:30 SECRECIÓN APICAL DEL ANTÍGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B (HBSAG) EN CÉLULAS EPITELIALES POLARIZADAS. **Marzolo, M. P.**, Bull, P. y González, A. Depto. Inmunología Clínica y Reumatología, Fac. Medicina y Depto Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 16:00 ESTUDIO DE LA ORGANIZACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE *Solanum tuberosum*. **Zanlungo, S.** y Jordana, X. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 16:30 MODULACIÓN DE CANALES DE CALCIO DE TELENCEFALO DE RATA SENSIBLES A RYANODINA. **Marengo, J. J.**, Hidalgo, C. y Bull, R. Depto. Fisiología y Biofísica, Fac. Medicina, Universidad de Chile y C.E.C.S.
- 17:00 **Café**



17:30 **COMUNICACIONES LIBRES V (SALA A)**

Presidente: Nivaldo Inestrosa  
Secretario: Tulio Néñez

- 17:30 EFECTOS DE DIABETES SOBRE EL TRANSPORTE DE NUCLEÓSIDOS Y SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO EN ENDOTELIO HUMANO EN CULTIVO. Sobrevia, L., Mann, G.E., **Yudilevich, D.L.**, Facultad de Medicina, Universidad de Chile
- 17:45 ACTIVACIÓN DEL COTRASPORTADOR DE KCl, POR AGUA OXIGENADA (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). **Bize, I.**, Dunham, P.B., Dept. of Biology, Syracuse University, Syracuse, NY.
- 18:00 INSULINA ESTIMULA LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANAS Y DEL CITOESQUELETO DEL ERITROCITO HUMANO. **Ortolani, O.**, Rosenman, E., Canessa, M., Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 18:15 MATRIZ EXTRACELULAR Y BIOMINERALIZACIÓN DE LA CÁSCARA DEL HUEVO. **Fernández, M.S.**, Arias, J.L., Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- 18:30 ¿POTENCIA LA ACETILCOLINESTERASA LA TOXICIDAD DEL PÉPTIDO  $\beta$  AMILOIDE? **Calderón, F.**, Inestrosa, N.C., Departamento de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile.
- 18:45 REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE HIERRO EN CÉLULAS CACO-2. **Arredondo, M.**, Tapia, V., Néñez, M.T., Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

17:30 **COMUNICACIONES LIBRES VI (SALA B)**

Presidente: Juan Carlos Slebe  
Secretario: Ana María Jabalquinto

- 17:30 CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE RIÑÓN DE CERDO EN *Escherichia coli*. **Cárcamo, J.G.**, León, O., Reyes, A.M., Slebe, J.C., Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- 17:45 HISTONA H1 E HISTONAS NUCLEOSOMALES EN DOS GÉNEROS DE LA FAMILIA *Trypanosomatidae*. **Espinoza, I.**, Toro, G.C., Galanti, N., Hellman, U. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 18:00 DESNATURACIÓN DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA POR CLORHIDRATO DE GUANIDINA. **Reyes, A.M.**, Ludwig, H., Slebe, J.C., Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- 18:15 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE RESIDUOS DE CISTEÍNA E HISTIDINA POR EL REACTIVO K DE WOODWARD. **Bustos, P.**, Gajardo, M.I., Gómez, C., Jabalquinto, A.M. Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago.
- 18:30 AISLAMIENTO DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR *Pseudomonas spp.* **Hubert, E.**, Brevis, P., Lobos, O., Padilla, C., Departamento de Ciencias Biológicas y Área Microbiología, Universidad de Talca.
- 18:45 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS FERULOILESTERASA Y B XILANASA Y SU APLICACIÓN EN EL PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE PULPA DE CELULOSA. **Aguirre, C.**, Castillo, C., Durán N., Curotto, E., Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso. Instituto de Química, Universidad Estatal de Campinas, Brasil.

19:00 EFECTO DEL PH EN LA ENTALPÍA DE ACTIVACIÓN DE LA  $\beta$ -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS. **O'Reilly, S.**, Weber, M., Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Química, Facultad de Ciencias Bas. y Mat., Universidad Católica de Valparaíso.

19:30 **PREMIOS FUNDACIÓN CHILENA PARA BIOLOGÍA CELULAR (SALA A)**

19:45 Presentación mejor tesis de pregrado

20:15 Presentación mejor tesis de doctorado

21:00 **Comida**

22:15 **CONFERENCIA Luis Izquierdo Fernández (SALA A)**

UNA MIRADA A LA RELACIÓN ENTRE OXÍGENO, CÉLULAS Y ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS. **Leighton, F.**, Laboratorio de Citología Bioquímica y Lípidos, P. Universidad Católica de Chile.

## Viernes 29 de septiembre

9:00 **SIMPOSIO GENÉTICA MOLECULAR Y BIOMEDICINA (SALA A)**

Coordinadora: Pilar Carvallo

9:00 EL PROYECTO GENOMA HUMANO Y SU IMPACTO EN LA BIOMEDICINA. **Carvallo, P.**, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

9:30 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO CDR3 DEL GEN DE LA CADENA PESADA DE LA INMUNOGLOBULINA(IGH) EN LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA (ERM) EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA). RESULTADOS PRELIMINARES. **Barriga, F.**, Risueño, C., Salgado, C, Beressi, V., Becker, A., Campbell, M., Legües, M. E., Cabrera, M. E. P. Universidad Católica de Chile, Hospital Exequiel González Cortés, Hospital Luis Calvo Mackenna, Hospital Roberto del Río, Hospital del Salvador.

10:00 ESTUDIO GENÉTICO MOLECULAR DE LA FIBROSIS QUÍSTICA EN PACIENTES CHILENOS. **Riveros, N.**, Ríos, J. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

10:30 VARIANTES DEL GEN P450C11A5 (ALDOSTERONA SINTETASA) EN PACIENTES CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HTA) HIPORRENINÉMICA. **Fardella, C.**, Montero, J., Zhan, G. G., Rodríguez, H., Vignolo, P., Miller, W. Departamentos de Endocrinología y Medicina Interna, Escuela de Medicina y Centro de Investigaciones Médicas, P. Universidad Católica de Chile, Depto. de Pediatría, Universidad de San Francisco, California, USA.

11:00-11:30 **Café**

11:30 COMUNICACIONES LIBRES VII (SALA A)

Presidente: Norbel Galanti  
Secretario: Luz María Pérez

- 11:30 URIDINA DIFOSFATASA (UDPASA) DE APARATO DE GOLGI DE TALLOS DE ARVEJA. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN. **Norambuena, L.**, Orellana, A., Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 11:45 QUITINASAS EN LA RESPUESTA DE CITRUS LIMON A LA INOCULACIÓN CON PATÓGENOS. **Fanta, N.**, Pérez, L.M. Departamento Bioquímica y Biología Molecular, Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- 12:00 MUTACIONES EN EL INTRÓN III DEL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE HORMONA DE CRECIMIENTO AUTOSÓMICA DOMINANTE. **Missarelli, M.**, Mericq, V., Jara, A., Carvallo, P., Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, e Instituto Materno Infantil, Universidad de Chile, y Servicio de Endocrinología, Hospital Roberto del Río.
- 12:15 CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN pit-1 EN *C carpio*. **Kausel, G.**, Vera, M.I., Figueroa, J., Molina, A., y Krauskopf, M., Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.
- 12:30 REACCIONES DE OXIDACIÓN CATALIZADAS POR LA Mn-PEROXIDASA DE *Ceriporiopsis subvermispora*. **Larrondo, L.**, Urzúa, U., Lobos, S., Larraín, J., Vicuña, R. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 12:45 POSIBLE HISTONA QUIMÉRICA EN LA CROMATINA DE *Trypanosoma cruzi*. **Galanti, N.**, Toro, G.C., Wernstedt, C., Hellman, U., Depto. Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

13:00 Almuerzo

15:00 INCORPORACIONES (SALA A)

Presidente: Tito Ureta  
Secretario: José Chianale

- 15:00 EFECTO DE FIBRATOS EN LA INDUCCIÓN DEL GEN MDR2 Y LA SECRECIÓN BILIAR DE FOSFOLÍPIDOS EN EL RATÓN. **Wielandt, A. M.**, Vollrath, V., Amigo, L., Rigotti, A., González, S., Andrade, L., Pizarro, M., Nervi, F., Accatino, L. y Chianale, J. Departamentos de Gastroenterología y Anatomía Patológica, P. Universidad Católica de Chile.
- 15:30 SÍNTESIS DE HISTONAS EN *Trypanosoma cruzi*. **Sabaj, V.**, y Galanti, N. Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 16:00 FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATO INHIBE LA SÍNTESIS DE GLICÓGENO EN OOCITOS DE RANA. **Kessi, E.**, Guixé, V., Preller, A. y Ureta, T. Depto. de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias y Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 16:30 UNIÓN COVALENTE DEL RADICAL  $\alpha$ -HIDROXIETILO A PROTEÍNAS. ¿UN NUEVO MARCADOR DE CONSUMO DE ALCOHOL? **Moncada, C.**, Varghese, G. e Israel, Y. Depto. de Ciencias Farmacológicas y Toxicológicas, Universidad de Chile. Department of Pharmacology, University of Toronto. Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Jefferson Medical College.

17:00 Café

17:30 **COMUNICACIONES LIBRES VIII (SALA A)**

Presidente: Jorge Babul  
Secretario: Ariel Orellana

- 17:30 **MÉTODO PARA MEDIR TASAS DE CICLO FÉLIL EN CONDICIONES DE METABOLISMO GLICOLÍTICO Y GLUCONEOGENICO.** Guixé, V., Torres, J.C., Babul, J., Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 17:45 **HOMOLOGÍA FUNCIONAL ENTRE LA PROTEÍNA PXA1 DE *Saccharomyces cerevisiae* Y LA PROTEÍNA DE LA ADRENOLEUCODISTROFIA HUMANA.** Sapag, A., Valle, D., Department of Pediatrics, School of Medicine, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA.
- 18:00 **EL ÁCIDO NORDIHIROGUAYARÉTICO (NDAGA) COMO RESTAURADOR DE LA SENSIBILIDAD A DROGAS EN EL CARCINOMA TA3 DE RATÓN SELECCIONADO POR RESISTENCIA A METOTREXATO.** Ferreira, J., Pavani, M., Pezoa, J., Berrocal, L., Cordano, G., Muñoz, S., Guerrero, A., Departamentos de Bioquímica y Química y Medicina Experimental, Facultad de Medicina y Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- 18:15 **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE GENES INDUCIBLES POR FRÍO EN ESPECIES DEL GÉNERO *Solanum*.** Meza-Zepeda, L., Baudo, M., Heino, P., Palva, T., Meza-Basso, L. Programa de Biología Vegetal, Universidad de Talca. Department of Molecular Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia.
- 18:30 **UNIÓN DE PEROXIDASA A MEMBRANAS DE RIBETE EN CEPILLO DEL INTESTINO DE *C. carpio*.** Amthauer, R., Tobar, L., Goicoechea, O. Instituto de Bioquímica, Instituto de Embriología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- 18:45 **TRANSPORTE DE UDP-GLUCOSA EN VESÍCULAS DE GOLGI OBTENIDAS DESDE TALLOS DE ARVEJA.** Muñoz, P., Orellana, A. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 19:00 **ESTIMULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO EN GLÁNDULAS GÁSTRICAS AISLADAS.** Fuentes, O., Mann, G.E., Sobrevía, L. Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad del Bío-Bío,
- 19:15 **EFEECTO DE ANÁLOGOS DE ACIL-CARNITINAS, INHIBIDORES DE PROTEÍNA QUINASA C *IN VITRO*, EN DESARROLLO TUMORAL *IN VIVO*.** Rojas, S., Cárdenas, L., Vargas, L. y Bronfman, M. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

19:30 **PREMIO MEDALLA HERMANN NIEMEYER F.**

19:45 **CONFERENCIA Osvaldo Cori Mouilly (SALA A)**

Effects of vesicles on chemical and biological reactivity. Chaimovich, H. Instituto de Química, Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil.

21:00 **Comida - Fiesta**

## Sábado 30 de septiembre

### 10:00 COMUNICACIONES LIBRES IX (SALA A)

Presidente: Mario Rosemblatt

Secretario: Miguel Bronfman

- 10:00 ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEÍNA SRY DETERMINANTE DEL SEXO MASCULINO EN HUMANOS. **Salas, L.**, Rosemblatt, M., McElreavey, K., Fellous, M., Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Universidad de Chile. Laboratoire d'Immunogénétique Humaine, Institut Pasteur, Francia.
- 10:15 RESPUESTA GLOBAL DEL ARQUEON *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 FRENTE A LA HAMBRUNA DE FOSFATO. **Osorio, G.**, Jerez, C.A., Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 10:30 ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES MEDIADA POR ÁCIDO SALICÍLICO EN TABACO. **Stange, C.**, Holuigue, L., Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 10:45 LA INDUCCIÓN DE LA AGREGACIÓN DEL AMILOIDE POR LA ACETILCOLINESTERASA DEPENDE DE LA ESTRUCTURA DEL PÉPTIDO  $\beta$ -AMILOIDE. **Alvarez, A.R.**, Inestrosa, N.C., Departamento de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile.
- 11:00 ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE LA SUBUNIDAD  $\alpha'$  DE LA PROTEÍNA QUINASA CK2. **Antonelli, M.**, Rojo, D., Daniotti, J., Allende, J., Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 11:15 EFECTOS DEL VINO SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA. **Castro, R.C.**, Barriga, C., Leighton, F., Laboratorio Citología Bioquímica y Lípidos, P. Universidad Católica de Chile.
- 11:30 CAMBIOS CONFORMACIONALES DE CALSECUESTRINA, UNA PROTEÍNA INTRARRETICULAR, DEPENDIENTE DE  $Ca^{2+}$ ,  $K^{+}$  Y pH. **Rodríguez, P.**, Donoso, P., Hidalgo, C., Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 11:45 IDENTIDAD DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE ACIL-COENZIMO A TIOÉSTERES DE CARCINÓGENOS NO GENOTÓXICOS EN CITOSOL DE HÍGADO DE RATA. **Silva, C. O.**, Urrea, R., Loyola, G. y Bronfman, M. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 12:00 LA PROTEÍNA TAU SE ASOCIA A LOS CENTROSOMAS EN DIFERENTES TIPOS CELULARES. **Tapia, L.**, Cross, D., Garrido, J., Maccioni, R.B. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 12:15 TRANSPORTE INTRAHEPÁTICO DE COLESTEROL: LA PROTEÍNA-2 TRANSPORTADORA DE ESTEROLES (SCP-2) PARTICIPA EN SU TRANSPORTE DESDE EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO A LA BILIS. **Puglielli, L.**, Rigotti, A., Amigo, L., Néñez, L., Greco, A., Santos, M. y Nervi, F. Depto. de Gastroenterología y Centro para la Prevención y Tratamiento del Cáncer Digestivo, Facultad de Medicina, Depto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile y Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma Italia.

# RESUMENES

**1 - HISTONAS DEL PLATELMINTO *Echinococcus granulosus*.** GALINDO, M. y GALANTI, N. Laboratorio de Biología Molecular. Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, U. de Chile.

Las histonas son proteínas implicadas en la organización y función de la cromatina en la mayor parte de los eucariontes. Estas proteínas se han mantenido muy conservadas durante la evolución biológica. No obstante, en la última década se ha probado que en protozoos y otros eucariontes inferiores, existen histonas altamente divergentes. Los helmintos constituyen un grupo ancestral y diverso, al igual que los protozoos. Dentro de este grupo, los platelmintos comprenden los representantes más primitivos de los animales con simetría bilateral. En este trabajo se presenta la caracterización de las histonas en un platelminto, *E. granulosus*, forma protoescólice.

Histonas extraídas de cromatina de protoescólices se analizaron por electroforesis en poliacrilamida. Se observó proteínas con migración electroforética similar a histonas H2A, H1, H3, H2B y H4 de espermio de erizo de mar y timo de ternera. Se observó además, una proteína de alta movilidad electroforética en geles ácidos. Por otra parte, se extrajo histona H1 de la cromatina por solubilidad diferencial; estas proteínas se purificaron por HPLC y se analizó su composición de aminoácidos. Dos proteínas presentaron solubilidad característica de histonas H1; sólo una de éstas presentó elución por HPLC propia de histona H1. Finalmente, las histonas del protoescólice muestran variantes.

Se concluye que los protoescólices de *E. granulosus* presentan histonas posiblemente conservadas respecto a eucariontes superiores; sin embargo, este parásito tendría dos histonas H1, una similar a la de eucariontes superiores, aunque con algunas diferencias, y otra similar a la de algunos protozoos. Esta particularidad podría estar relacionada con la ubicación de este platelminto en la escala evolutiva.

Financiado por Proyecto DTI B3594 - Universidad de Chile.

**2 - LOCALIZACION PERINUCLEAR DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA.** (Perinuclear localization of fructose-1,6-bisphosphatase). SÁEZ, D., FIGUEROA, C. y SLEBE, J.C. Instituto de Bioquímica e Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

No obstante la gran cantidad de información disponible sobre el metabolismo celular, existe poca información acerca de la organización del mismo. La forma y organización del metabolismo intermediario podría comprender asociaciones a estructuras subcelulares y/o la formación de complejos proteína-proteína. Al respecto, se ha informado la localización de isoenzimas de hexoquinasa con distintos componentes celulares, en particular la hexoquinasa III en la región perinuclear (Preller, A. y Wilson, J. (1992) Arch. Biochem. Biophys. 294, 482-492). La enzima gluconeogénica fructosa-1,6-bisfosfatasa es considerada "soluble", sin embargo no existen datos definitivos acerca de su localización celular. Utilizando anticuerpos contra la enzima renal, ésta se localizó en células del tubo contorneado proximal en el riñón y en hepatocitos vecinos a los espacios porta en el hígado. Asimismo, se sugirió una asociación con el núcleo (Sáez, D. *et. al.* (1994) *Noticiero de Biología 2*, p 120 (R-91)).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la localización intracelular de fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón e hígado de rata mediante técnicas de microscopía y de fraccionamiento celular. La localización intracelular de la enzima de riñón e hígado fue determinada por inmunocitoquímica; en ambos tejidos se observa una tinción intensa en el núcleo. El tejido hepático muestra además una reacción fuerte en la membrana plasmática y débil en el citoplasma. En el riñón la inmunoreactividad es fuerte en la región basal y débil en el citoplasma. Datos de microscopía confocal indican que la enzima se encuentra localizada de preferencia en la región perinuclear. Homogeneizados de riñón e hígado de rata presentan un notable aumento de la actividad bisfosfatásica al medirse ésta en presencia de Tritón X-100. Núcleos aislados de riñón e hígado muestran actividad sólo en presencia del detergente. Estos resultados sugieren que la asociación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa con la región perinuclear es lábil.

FONDECYT 1951215, 2930044. DID UACH S-95-41).

**3 - LA EXPRESION DE DECORINA SE ENCUENTRA FUERTEMENTE DISMINUIDA EN FIBROBLASTOS PROVENIENTES DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER** (The expression of decorin is highly diminished in Alzheimer's disease fibroblasts). BRANDAN, E., MELO, F., GARCÍA, M.A. y CONTRERAS, M. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Se ha demostrado previamente que la adhesión celular se encuentra disminuida en pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer (EA). El objetivo de este trabajo fue determinar si la síntesis de proteoglicanos por fibroblastos de piel provenientes de pacientes con EA se encuentra alterada con respecto a individuos normales.

No se detectaron cambios significativos en la incorporación de sulfato radioactivo, ni en la composición de glicosaminoglicanos en los medios de incubación provenientes de las distintas líneas celulares. Sin embargo, el análisis cromatográfico y por medio de electroforesis en SDS-PAGE de los proteoglicanos secretados por las líneas celulares revelaron que un proteoglicán de dermatán sulfato de 150-125 kDa estaba fuertemente disminuido en fibroblastos provenientes de EA. Las características moleculares de este proteoglicán corresponden a decorina. Análisis de inmunotransferencia indicaron que la cantidad de decorina estaba disminuida en medios provenientes de fibroblastos de pacientes con EA con respecto a individuos normales. Además análisis de los transcritos para decorina indican que éstos se encuentran altamente disminuidos en los fibroblastos de los pacientes. Por otra parte no se detectaron cambios en los niveles de glicopéptido, un proteoglicán de heparán sulfato asociado a la membrana de los fibroblastos.

Estos resultados fuertemente sugieren que la expresión y síntesis de decorina esta afectada en fibroblastos de piel de pacientes con EA. Los resultados se discutirán en términos de la disminuida adhesión celular observada para estas células derivadas de pacientes con EA y de las propiedades funcionales de la decorina.

(Financiado por FONDECYT 1930565)

**4 - FACTORES SOLUBLES SECRETADOS POR CELULAS DE PRÓSTATA BLOQUEAN LA DIFERENCIACION DE OSTEOBLASTOS EN CULTIVO** (Prostate-derived soluble factors block osteoblast differentiation in culture) SILVA S., SANTIBÁÑEZ J.F. y MARTÍNEZ, J. Unidad de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile.

Uno de los rasgos más característicos del cáncer de próstata es su capacidad de invadir el tejido óseo. Una vez colonizado el hueso, las células de próstata inducen una reacción que estimula la proliferación de osteoblastos.

El presente trabajo estudia la reacción de osteoblastos de rata en cultivo al estímulo de factores secretados por la línea celular PC-3, clon de origen prostático derivado de una metástasis ósea.

Nuestros resultados indican que medios condicionados por las células PC-3 (MC PC-3) estimulan la proliferación de osteoblastos de calvaria de rata, inhiben la actividad de fosfatasa alcalina (AP) -un marcador temprano de diferenciación- y el proceso de mineralización, expresado como acumulación de calcio, marcador tardío de diferenciación. La inhibición de la expresión de AP y de la mineralización depende de la presencia de MC PC-3 durante la fase proliferativa del cultivo y sugiere que ambos procesos ocurren en forma secuencial.

El efecto inhibitorio de MC-PC-3 no es revertido por Dexametasona lo que sugiere que el factor prostático y el glucocorticoide no comparten un sitio común de acción.

Mediciones de la capacidad proliferativa de subcultivos de células óseas cultivadas en presencia de MC PC-3 muestran que éstas retienen una fracción de su capacidad de multiplicación lo que sugiere que el MC PC-3, al bloquear el proceso de diferenciación, aumenta la concentración relativa del pool celular proliferativo.

Financiamiento: FONDECYT 1950398

**5 - CAMBIOS ESTRUCTURALES EN CELULAS OXINTICOPEPTICAS DE *Aplodactylus punctatus* DURANTE LA SECRECIÓN DE ACIDO.** (Structural changes in the oxynticopeptic cells of *A. punctatus* during acid secretion). FREIRE, M., CABELLO, A., GÁLVEZ, M., ORMÁZABAL, A., MESSÉN, L. y GARRIDO, J. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

En las células oxínticas de la mucosa gástrica de la rata el comienzo de la secreción provoca cambios en la organización ultraestructural de sus polos apicales, apareciendo elementos tubulovesiculares de gran diámetro, probablemente originados por fusión de los túbulos membranosos presentes en el reposo. Estos elementos representan estados intermedios en el proceso de incorporación de las membranas tubulares a la membrana plasmática apical (Vial, J.D. *et al.*, Am. J. Anat. 172, 291-306, 1985). Observaciones realizadas en la mucosa del pez herbívoro *Aplodactylus punctatus* mostraron que la activación de la secreción gástrica por la alimentación produce una imagen estructural en la que los estados intermedios son mucho más abundantes que los presentes en la rata, tanto en similares circunstancias como luego de estimulación farmacológica. Sin embargo, la estimulación mediante administración parenteral de histamina de peces mantenidos en ayunas provoca la rápida instalación de la imagen de secreción, apareciendo sólo un reducido número de estados intermedios. Estos resultados apoyan la hipótesis ya planteada que la escasez de imágenes de estados intermedios es debida a la acelerada cinética del proceso, y sugieren que la activación fisiológica de la secreción en *A. punctatus* ocurriría con cinética más lenta y probablemente a través de etapas y mediadores diferentes de los activados por la histamina, constituyendo a estas células en modelo de interés para el estudio del tráfico de membranas concomitante a la secreción de ácido.

(Proyecto FONDECYT N°1951000).

**6 - ESTUDIO DE LAS UNIONES EN HENDIDURA DE ASTROCITOS DURANTE LA REOXIGENACION POSTHIPOXIA** (Study of astrocyte gap junction during reoxygenation posthypoxia). MARTÍNEZ, A. y SÁEZ, J.C. Depto. de Cs. Fisiol., Fac. de Cs. Biol. P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: N. Inestrosa).

Los astrocitos pueden acoplarse a través de uniones en hendidura (UH), lo que les permite funcionar como sincicio. Las UH de los astrocitos están formadas exclusivamente por conexina43 (Cx43) y su forma fosforilada se asocia al estado funcional de las UH. Un sincicio glial ofrece una vía de señalización intercelular extraneuronal y gran capacidad tampón para diluir iones y sustancias captadas del líquido intersticial, lo que favorece la función neuronal. Es sabido que los astrocitos son resistentes a la hipoxia y reoxigenación, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, se desconoce si se afectan sus capacidades funcionales mediadas por las UH. En este trabajo estudiamos el estado funcional de las UH (permeabilidad a amarillo de Lucifer, AL) y determinamos los niveles y el estado de fosforilación de la Cx43 (inmunotransferencia) en cultivos primarios de astrocitos de la corteza cerebral de rata, sometidos a hipoxia (12 h, 1-2,5% de O<sub>2</sub>) y reoxigenación (4 h, 18% O<sub>2</sub>). Se observó que la hipoxia indujo una disminución de los niveles de Cx43, principalmente a expensas de su forma defosforilada, que persistió durante las dos primeras horas de reoxigenación, y posteriormente mostró recuperación progresiva, alcanzando niveles normales a las 4 h de reoxigenación. Durante los primeros 15 min de reoxigenación, la permeabilidad a AL fue comparable a la de los controles, pero a los 30 min se detectó una drástica reducción en la permeabilidad a AL, la que se revirtió completamente a las 4 h de reoxigenación. Luego, en astrocitos sometidos a hipoxia, la reoxigenación induce un cambio metabólico dependiente de oxígeno que provoca inhibición reversible de las UH, probablemente actuando a nivel de compuerta, y no a nivel de la expresión o modificación postraduccional de la Cx43.

FONDECYT 1930690 (J.C.S.).

**7 - PARTICIPACION DE SINDECAN-1 DURANTE LA DIFERENCIACION DE CELULAS MUSCULARES C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.** (Involvement of syndecan-1 during C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> skeletal muscle cells differentiation). LARRAÍN, J.\* y BRANDÁN, E. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Sindecán-1 (sin-1) es un proteoglicán de heparán sulfato (PGHS) presente en la membrana y en la matriz extracelular (MEC). Se encuentra principalmente en epitelios maduros y su expresión está altamente regulada durante el desarrollo. La presencia en la zona regulatoria del gen de sin-1 de secuencias de unión para factores de transcripción del tipo HLH (MyoD, miogenina) y el requerimiento de un PGHS para que bFGF inhiba la diferenciación muscular han permitido postular que sin-1 sería el co-receptor de bFGF y que su expresión estaría regulada negativamente por miogenina. De esta forma la disminución de sin-1 durante la diferenciación impediría que bFGF ejerza su efecto inhibitorio garantizando el compromiso de los mioblastos a diferenciarse a miotubos (Bernfield *et al.*, Development, Supp., 205-212, 1993).

El objetivo de este trabajo es estudiar la expresión de sin-1 durante la diferenciación *in vitro* de células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Para esto mediante Northern Blot se analizaron los niveles del ARNm de sin-1. En mioblastos se encontraron dos ARNm de 3.1 y 2.5 kb característicos de sin-1. Sin embargo el nivel de expresión de estos transcritos no cambió durante la diferenciación en contraste al fuerte aumento en la expresión del transcrito de miogenina. Para analizar la dependencia de la expresión de sin-1 de proteínas del tipo Myo D se realizó la diferenciación en presencia de un inhibidor de éstas (butirato 5 mM) lo que permitió demostrar que su expresión es miogenina-independiente.

Estos resultados muestran que la expresión de transcritos de sin-1 es constitutiva e independiente de miogenina. Por lo tanto podemos postular que la función de sin-1 en células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> sería secuestrar bFGF y/u organizar la formación de la MEC.

(\* Becario Fundación Andes. Financiado por FIRCA RO3TW00093 y FONDECYT 1930565: TWAS 93-124 RG/BIO/LA)



**8 - CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LAS CELULAS NK MEDIADOS POR BACTERIAS.** (Changes in natural killer cell activity mediated by bacteria). MIRANDA, D. y PUENTE, J. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Las células natural killer (NK) corresponden a una subpoblación de linfocitos granulares grandes cuyo fenotipo más aceptado es CD3-, CD4-, CD16+ y CD56+. La principal característica de estas células y que las define funcionalmente es su propiedad de ejercer una acción citolítica espontánea no mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMC-NK). Las células NK pueden lisar células tumorales, células infectadas por virus, células infectadas por bacterias y también microorganismos como bacterias. Por otro lado hemos descrito una alta disminución de la CMC-NK en una patología infecciosa severa como el shock séptico. Toda esta información parece indicar que la función defensiva de las células NK es también afectada en la patología infecciosa. En el presente trabajo, se estudió la acción de bacterias sobre las células natural killer, tanto para analizar su acción sobre la función citolítica como también sobre la etapa de activación que involucra la participación de proteínas quinasas y fosfoproteínas. Para ello se coincubaron bacterias *Salmonella typhi* cepa silvestre y mutantes fijadas con glutaraldehído 0.25% por 72 h. con células mononucleadas. Posteriormente se analizaron los cambios en la CMC-NK, la modulación por genisteína y los cambios en el patrón de fosforilación de proteínas. La CMC-NK se determinó mediante el ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr utilizando células K562 como célula blanco. Los estudios de fosforilación de proteínas se realizaron incubando células mononucleadas con <sup>32</sup>Pi (500 uC/ml), luego las proteínas fosforiladas fueron analizadas por electroforesis y visualizadas mediante autoradiografía. Nuestros resultados indican que las bacterias pueden modular la CMC-NK. En los casos de estimulación de la CMC-NK coincide con una mayor actividad fosforilativa observándose la presencia de fosfoproteínas particulares. Esta estimulación de la CMC-NK es inhibida por genisteína. La inhibición de la CMC-NK por bacterias, se correlaciona con una menor actividad fosforilativa. Finalmente podemos concluir que la interacción de las células NK con bacterias modifica su función lítica debido probablemente a cambios en la etapa de activación de estas células.

Financiado por proyecto Fondecyt 1930991

**9 - ACCION SINERGISTA DE EGF SOBRE LA SINTESIS DE DNA EN PAROTIDA DE RATON INDUCIDA POR AGONISTAS b-ADRENERGICOS** ( Synergist action of EGF on mouse parotid DNA synthesis induced by b-adrenergic agonists). GONZÁLEZ B., M.J., FAÚNDEZ, V., GONZÁLEZ, A., LÓPEZ, R. y ALLIENDE, C. Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, y Depto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Facultad de Medicina, P. Universidad Católica de Chile.

Hemos descrito la mediación del receptor β1-adrenérgico en la inducción de la síntesis de DNA en glándula parótida de ratón (González, M.J. y col. B.B.A. 1222, 208-214, 1994). Se requiere de un período prolongado de interacción del agonista con el receptor para que la síntesis de DNA ocurra. La desalilación, que es uno de los efectos asociados a la acción β-adrenérgica en este sistema, es capaz de exponer receptores crípticos e inactivos. Como en la inducción de proliferación celular es frecuente la participación de más de un receptor estudiamos si los efectos de agonistas β-adrenérgicos sobre la síntesis de DNA involucra también receptores de factores de crecimiento, particularmente el factor de crecimiento epidérmico EGF, dado el carácter epitelial de la parótida.

En este trabajo observamos que el EGF por sí solo no tiene efecto inductor de síntesis de DNA en la parótida de ratones; que el isoproterenol (IPR) induce una respuesta proliferativa 16 veces mayor que los controles; y que la administración de IPR y EGF induce, en cambio, una síntesis de DNA 25 veces mayor que el control. Este efecto indica una acción potenciadora del EGF sobre la respuesta de síntesis de DNA gatillada por IPR. Estudios preliminares con radioligando y western-blot mostraron la presencia del receptor de EGF en la parótida. El IPR indujo, además, un aumento de ese receptor a las 2 horas, detectado por inmunoblot en una fracción enriquecida de membrana plasmática.

Financiamiento: DTI. U. de Chile B-3208, FONDECYT #1951132.

**10 - INDUCCION DE LOS PLIEGUES NEURALES EN *Xenopus*: UN MODELO CELULAR Y MOLECULAR** (Induction of the neural folds in *Xenopus*: a cellular and molecular model). MAYOR, R., MANCILLA, A., GUERRERO, N. y MARTÍNEZ, C. Laboratorio de Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La diferenciación del sistema nervioso comienza con la inducción neural, donde una señal es enviada desde el mesodermo hacia el ectodermo, el cual responde diferenciándose como tejido nervioso. Sin embargo sólo una precisa región del ectodermo responde a esta inducción; el resto se diferencia como epidermis. El problema en que estamos interesados es entender cómo se establece el límite de la inducción neural y cómo en este límite ocurre la inducción de los pliegues neurales.

Para realizar un estudio de la inducción de los pliegues neurales contamos con dos genes recientemente clonados que se expresan en los pliegues neurales presuntivos. Estos son los genes *Xsnail* y *Xslug*, los que codifican para factores de transcripción. Analizando la expresión de estos genes mediante hibridación in situ in toto, estudiamos la inducción de los pliegues neurales temporal y espacialmente. Mediante experimentos de recombinación de tejidos identificamos al mesodermo dorsal y lateral como los tejidos inductores de los pliegues neurales; a través de experimentos de disección de los pliegues neurales en distintos estadios y de recombinaciones con el tejido inductor, demostramos que al mismo tiempo que la capacidad del ectodermo para responder a la inducción de los pliegues neurales se pierde, la inducción de dicho tejido se establece definitivamente. Realizando trasplantes de placa neural en epidermis demostramos que es posible inducir pliegues neurales por una interacción entre estos dos tejidos. Finalmente, hemos integrado todos nuestros resultados en el siguiente modelo: Durante el inicio de la gastrulación ocurriría un primer nivel de inducción de los pliegues neurales por una señal proveniente del mesodermo; más tarde, al final de la gastrulación, esta primera señal sería reforzada por una segunda inducción proveniente de la interacción de la placa neural y la epidermis que la rodea.

Con el objeto de estudiar las posibles moléculas involucradas en esta inducción realizamos experimentos de sobreexpresión de distintas posibles moléculas inductoras. Nuestros resultados sugieren que se requiere de la interacción de dos señales para inducir los pliegues neurales. Estas serían la señal dorsal Noggin y la señal ventral FGF. Actualmente estamos estudiando si estas moléculas actúan directa o indirectamente en la inducción de los pliegues neurales.

Este trabajo fue financiado por FONDECYT (1940231), THE THIRD WORLD ACADEMY OF SCIENCE (93 533 RG/BIO/LA) y Fundación Andes.

**11 - REGULACION DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR DE EGF VIA AMPc** (cAMP mediated regulation of the EGF receptor expression). WERNER, E., BRAVO, M. y GONZÁLEZ, A. Depto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Fac. Medicina, y Depto. Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile.

La función del R-EGF en la membrana plasmática, puede ser regulada por mecanismos que inducen cambios en la actividad de unión del ligando (desensibilización) y/o variaciones en el número de receptores en la superficie celular, ya sea por activación de receptores crípticos o aparición de nuevos receptores. En el promotor de este receptor no se han detectado secuencias de regulación por AMPc. Sin embargo, el AMPc es capaz de inducir la expresión de un gen reportador bajo el control de este promotor transfectado en células HeLa, aunque el receptor endógeno no es inducido.

En este trabajo se encontraron evidencias de que AMPc induce la expresión del REGF endógeno en dos sistemas celulares distintos. Forskolin aumentó los niveles de unión de 125I-EGF células de la granulosa de ovario en cultivo primario y en las células HUH7 derivadas de un hepatoma humano, y no tuvo efecto en las células A431 y HeLa. Una caracterización de este efecto mostró que aumenta la biogénesis del receptor en estas células. El mecanismo de regulación involucrado puede ser activado por hormonas que interaccionan con otros receptores en la superficie celular, y afectar también la expresión de elementos del sistema de transducción del REGF.

(Financiado por FONDECYT #1951132. E.W. y M.B. son becarios de la Vicerrectoría Académica de la PUC).

**12 - INSULINA ESTIMULA LA FOSFORILACION DE TIROSINA Y SERINA DE PROTEINAS DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO HUMANO.** (Insulin stimulates tyrosine and serine phosphorylation of erythrocyte membrane proteins). **MANRÍQUEZ E., ORTOLANI D., ROSENMANN E., y CANESSA M.** Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago.

La insulina promueve una cascada de fosforilación (FOSF) que se inicia con activación de la quinasa (Q) tirosínica (Tyr) del receptor que continúa con activación de Qs de Ser/Thr como lasMAPs, C y S6. Aunque el eritrocito (ERIT) humano posee receptores de insulina, no se conoce que parte de esta cascada esta presente en la membrana. La estimulación del intercambiador de Na por H del ERIT, inducida por insulina, nos llevó a investigar qué eventos de esta cascada de FOSF se relacionan con la activación del transporte. ERIT de sujetos que ayunaron por 12 h se incubaron por tiempos variables (2-45') con insulina (100  $\mu$ U/ml) y se prepararon membranas (MB) por lisis hipotónica. Se separaron las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se determinó la presencia de FOSF de Tyr utilizando el anticuerpo monoclonal 4G10 (n=4). La FOSF en Tyr de las bandas 1,2,3 y 5 aumentó rápidamente (2') por acción de la insulina y de las proteínas del citoesqueleto 4.1, 4.2 y 6.

El curso temporal de la actividad Q-Tyr se estudió incubando MBs con ATP32 (50  $\mu$ C/ml), ATP 200  $\mu$ M, MnCl<sub>2</sub>,  $\pm$  Vanadato y  $\pm$  Poly (Glu,Tyr) (PGT), por tiempos variables (n=7). La FOSF de la MB se determinó por precipitación con ácido tricloroacético, lavado en filtros de papel y conteo. La insulina activó tempranamente (2-5') la FOSF de la MB y PGT que decayó después de 15'.

El curso temporal de FOSF de Ser/Thr se determinó en forma similar pero reemplazando MnCl<sub>2</sub> por MgCl<sub>2</sub> (n=3). La insulina estimuló una FOSF mas tardía que la de Q-Tyr alcanzando el máximo a los 15' y decayendo lentamente hasta 45'. El curso temporal de FOSF de Ser/Thr se correlaciona mejor con el de activación del intercambiador.

Financiado por Fondecyt 194-0339 y Fundación Andes.

**13 - UNIONES EN HENDIDURA EN CELULAS ENDOTELIALES DE MICROCIRCULACION DE CEREBRO: CARACTERIZACION Y REGULACION POR BRADICININA Y ENDOTOXINA** (Gap junctions from brain capillary endothelial cells: characterization and regulation by bradykinin and endotoxin) **BRANES, M.C. y SÁEZ, J.C.** Depto. de Cs. Fisiol., Fac. de Cs. Biol. P. Univ. Católica de Chile. (Patrocinio: N. Inestrosa).

Las uniones en hendidura (UH) son conglomerados de canales intercelulares que median el intercambio de iones y moléculas de hasta aproximadamente 1.2 kDa. Las UH están compuestas por conexinas (Cxs), proteínas homólogas codificadas por una familia de genes. La expresión de éstas es tejido dependiente y una célula puede expresar más de un miembro de la familia. Las células endoteliales (CEs) también se comunican (acoplan) entre sí y con células musculares lisas vía UH. En el foco inflamatorio, las CEs expresan diversas proteínas de adhesión que intervienen en la interacción con leucocitos activados atraídos al foco y establecen, en forma transiente, UH con las CEs. El paso de señales intercelulares entre los distintos tipos celulares depende del número de canales de UH funcionales. Nos interesa evaluar el grado de comunicación entre CEs de la barrera hematoencefálica y el efecto de la estimulación con bradicinina (BC, 1  $\mu$ M) o endotoxina (LPS, 1  $\mu$ g/ml), agentes inductores de respuesta inflamatoria. Se utilizó cultivos primarios de CEs de capilares de corteza cerebral de rata. El estado funcional de las UH fue evaluado por la permeabilidad a amarillo Lucifer (AL), la distribución celular de la Cx43 por inmunocitoquímica y los niveles y estados de fosforilación de la Cx43 por inmunotransferencia. En condiciones basales las CEs se encontraban bien acopladas y tanto BC como LPS no afectaron cualitativamente el estado funcional de las UH, ni la razón Cx43 fosforilada/Cx43 defosforilada. Sin embargo, ambos agentes indujeron un aumento progresivo en los niveles de Cx43 entre 15 y 180 min postratamiento. La inmunoreactividad a Cx43 aumentó tanto en el citoplasma como en regiones de aposición de membranas celulares. Lo último, sugiere que se produce un aumento en el grado de acoplamiento celular, que deberá ser evaluado con técnicas más sensibles. Proponemos que un aumento en el grado de comunicación intercelular favorece la propagación de señales intercelulares que participan en la respuesta inflamatoria.

FONDECYT 1930690 (J.C.S.).

**14 - REGULACION DE COLINESTERASAS, PROTEINA PRECURSORA DEL AMILOIDE Y FRAGMENTOS AMILOIDOGENICOS POR LAMININA Y EL GRADO DE PROLIFERACION CELULAR.** (Regulation of cholinesterases, amyloid precursor protein, and amyloidogenic fragments by laminin and cell proliferation). **BRONFMAN, F.C.\* e INESTROSA, N.C.** Depto. de Biología Celular y Molecular, P.Universidad Católica de Chile.

La proteína precursora del amiloide (APP), está involucrada en la enfermedad de Alzheimer y su procesamiento lleva a la formación del péptido amiloide el que forma las placas seniles. En ellas también se encuentran las colinesterasas (AChE y BuChE). Hemos evaluado algunos factores que podrían estar involucrados en la regulación del APP, los péptidos amiloidogénicos derivados de él y las colinesterasas utilizando células neuronales (Neuro2A).

Nuestros resultados indican que la disminución de la proliferación celular aumenta casi diez veces la actividad de la AChE, por su parte la BuChE mantiene sus niveles basales o tiende a disminuir. Estos cambios son reminiscentes de lo que ocurre en el desarrollo embrionario. El aumento de actividad de la AChE se expresa tanto en las formas G<sub>1</sub> Y G<sub>2</sub>. El APP no estaría regulado por la proliferación celular, sin embargo, uno de sus fragmentos amiloidogénicos de 35kD aumenta al disminuir la proliferación celular. Por otra parte una glicoproteína de la matriz extracelular, la laminina, es también capaz de regular la cantidad del fragmento de 35 kD sin alterar los niveles de la AChE.

Estos resultados sugieren que la cantidad de fragmentos amiloidogénicos del APP y la actividad de la AChE dependen del grado de proliferación celular, por otra parte, laminina, solo influencia la generación de los fragmentos amiloidogénicos. Esto indica que el efecto de la matriz extracelular (laminina) es selectivo en estimular la generación de fragmentos amiloidogénicos del APP.

\*Becaria CONICYT y financiado por FONDECYT N°1940694.

**15 - MUTACION SITIO-ESPECIFICA EN AMINOACIDOS ES-COGIDOS DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *S. cerevisiae*.** (Site-directed mutagenesis in selected aminoacids of *S. cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase). **KRAUTWURST, H. y CARDEMIL, E.** Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK) de levadura cataliza la siguiente reacción en presencia de Mn<sup>2+</sup>:



En trabajos previos [Bazaes et al. (1995) *FEBS Lett.* 360,207-210] hemos propuesto a Lys<sup>290</sup> como un posible residuo del sitio de unión del nucleótido. Adicionalmente, la comparación de la estructura primaria de esta enzima con la de otras proteínas de estructura tridimensional conocida que ligan nucleótidos, sugiere que Lys<sup>256</sup> podría estar involucrada en la reacción de transferencia de fosforilo entre ATP y OAA, y que Glu<sup>284</sup> podría ser un residuo importante en la ligazón del metal activador a la enzima. Para poner a prueba estas posibilidades hemos fabricado los mutantes Lys<sup>290</sup>Gln, Lys<sup>256</sup>Gln, y Glu<sup>284</sup>Gln. Los genes mutados se expresaron en la cepa *S. cerevisiae* PUK-3B, deficiente en PEPCK. Se encontró que los genes conteniendo las mutaciones que codifican para los reemplazos Lys<sup>256</sup>Gln y Glu<sup>284</sup>Gln produjeron enzimas no funcionales, en tanto que la mutación Lys<sup>290</sup>Gln produjo una enzima funcional. Esta última proteína fue purificada a homogeneidad, y se encontró que su espectro de difracción circular fue prácticamente idéntico al de la enzima nativa. Se determinaron los parámetros cinéticos *K<sub>m</sub>* y *V<sub>m</sub>* encontrándose que difieren muy poco de los de la enzima nativa. Los resultados están de acuerdo con un carácter esencial para Lys<sup>256</sup> y Glu<sup>284</sup>, y descartan cualquier función catalítica para la Lys<sup>290</sup>. Se trabaja en la obtención y caracterización de las PEPCKs Lys<sup>256</sup>Gln y Glu<sup>284</sup>Gln.

Financiado por DICYT- USACH 049441CU y FONDECYT 1941073.

**16 - CLONAMIENTO Y EXPRESION *in vitro* DE UN GEN DE *Leptospirillum ferrooxidans* QUE CODIFICA UN PROBABLE RECEPTOR QUIMIOTACTICO.** (Cloning and *in vitro* expression of a *Leptospirillum ferrooxidans* gene coding a putative chemotactic receptor). **DELGADO, M., TOLEDO, H. y JERÉZ, C. A.** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las bacterias móviles son atraídas o repelidas por ciertos agentes químicos, por medio de un sistema quimiosensorial que regula la motilidad celular controlando la dirección de rotación flagelar. *Escherichia coli* capta los estímulos ambientales mediante cuatro quimiorreceptores metilables de transmembrana muy similares entre sí: Tar para aspartato y maltosa, Tap para dipéptidos, Trg para ribosa y galactosa, y Tsr para serina. Nos hemos interesado en conocer el sistema quimiosensorial y adaptativo de *Leptospirillum ferrooxidans*, una bacteria quimiolitotrófica acidofílica altamente móvil que participa en los procesos de lixiviación bacteriana de minerales.

Para la técnica de Southern-blot se emplearon sondas marcadas con digoxigenina. Para la expresión de genes *in vitro*, empleamos marcación de las proteínas sintetizadas con [<sup>35</sup>S]metionina en un sistema dependiente de DNA, en el cual la transcripción y la traducción están acopladas. Para la inmunoprecipitación de los polipéptidos sintetizados se empleó un anticuerpo policlonal preparado contra el receptor Tar de *E. coli*.

En el DNA cromosomal de *L. ferrooxidans* encontramos una región que hibridizó con una sonda de 719 pb que contiene parcialmente el gen *tar* de *E. coli*, lo que sugiere la presencia de receptores quimiosensoriales en *L. ferrooxidans*. Esta región se clonó en el vector pGEM-3Z para generar el plasmidio recombinante pLf13. La expresión *in vitro* de este plasmidio mostró la síntesis de una proteína de *L. ferrooxidans* de 58 kDa que presentó reacción cruzada con anticuerpos contra el receptor Tar de *E. coli*. Estos resultados sugieren que *L. ferrooxidans* posee un gen homólogo al gen *tar* de *E. coli*, y que probablemente la proteína que codifica sea un receptor quimiotáctico. Para confirmar esta idea, actualmente estudiamos la metilación *in vitro* de esta proteína y se está secuenciando el inserto del plasmidio pLf13.

Financiado por proyectos FONDECYT 194/0379 y 2950024.

**17 - REPLICACION DEL DNA EN TERRITORIOS CELULARES DEL PROTOESCOLICE DE *Echinococcus granulosus*.** (DNA replication in cellular territories of the protozoan of *Echinococcus granulosus*) **GALINDO, M. y GALANTI, N.** Laboratorio de Biología Molecular, Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, U. de Chile.

*E. granulosus* es un platelminto agente causal de la hidatidosis. En su forma protoescolice puede diferenciar hacia gusano adulto o un estado quístico. Así, el protoescolice presenta un notable potencial de diferenciación. En trabajos previos hemos establecido que los protoescolices presentan 5 territorios celulares, cada uno de los cuales con una ubicación morfológica determinada y una constitución celular particular. En este trabajo, se presenta una caracterización de estos territorios respecto de algunos parámetros básicos de fisiología celular. Protoescolices de quistes hepáticos y pulmonares de oveja se incubaron en solución Hanks pH 7.2, o en líquido hidático con timidina-H3, uridina-H3 o leucina-H3, o en un medio que induce diferenciación (MCP), con timidina-H3, a 38°C. Posteriormente los protoescolices se procesaron para autorradiografía; además, se determinó la incorporación específica de cada uno de los radioisótopos en su respectiva macromolécula.

Los resultados indican que, en un estado basal, los protoescolices presentan activa síntesis de RNA y proteínas en todos los territorios celulares. Por el contrario, la síntesis de DNA está restringida a tres de estos territorios, observándose sólo un 0.5 - 2.0% de células que incorporan timidina-H3. Por otro lado, la incorporación de timidina-H3 en el DNA es mayor en protoescolices incubados en MCP que en Hanks. Se propone que los territorios con células en síntesis de DNA pueden participar en el crecimiento y diferenciación del protoescolice; el bajo índice de marcación en medio Hanks sugiere que esta actividad proliferativa podría estar relacionada con el crecimiento del protoescolice desde quiste hidatídico.

Financiado por Proyecto DTI B3594 - Universidad de Chile.

**18 - CLONAMIENTO Y SECUENCIACION DEL cDNA DE UNA ENDOXILANASA DEL HONGO *Penicillium purpurogenum*.** (Cloning and sequencing of an endoxylanase cDNA from the fungus *Penicillium purpurogenum*). **DÍAZ, R., \*PEIRANO, A., \*STEINER+, J. y EYZAGUIRRE, J.\*** Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, y +Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El hongo *Penicillium purpurogenum* es un activo productor de enzimas celulolíticas y xilanolíticas. Nuestro Laboratorio ha purificado y caracterizado varias enzimas del sistema xilanolítico del hongo, entre ellas 2 endoxilanasas (A y B). Se ha obtenido un transformante de levadura capaz de secretar ambas xilanasas y una beta-xilosidasa, lo que sugiere que los respectivos genes están formando un «cluster». Con el presente trabajo se ha iniciado un estudio destinado a establecer la relación estructural entre estos genes en el genoma del hongo.

Se procedió a preparar una genoteca de cDNA del hongo en *Escherichia coli*. Se detectaron clones positivos para la endoxilanasas B utilizando una sonda preparada por PCR, con partidores basados en la secuencia amino terminal de la enzima y secuencias conocidas de otras xilanasas. Uno de estos clones ha sido secuenciado utilizando el método de los didesoxinucleótidos.

La secuencia obtenida presenta un marco de lectura de 208 aminoácidos, con un péptido señal de 25 residuos. El peso molecular calculado para la proteína madura es de 19.360. Esta endoxilanasas pertenece a la familia G de las beta-glucanasas y tiene una gran similitud con las secuencias de otras 15 endoxilanasas de esta familia. Se destaca la presencia de varios residuos de aminoácidos que son invariantes en todas ellas y que podrían tener importancia en la función catalítica.

Este trabajo ha sido financiado con aportes de DIUC, UNIDO (91/0619) y FONDECYT (1930673).

**19 - IDENTIFICACION DE RESIDUOS DE HISTIDINA REACTIVOS EN LAS CARBOXYKINASAS FOSFOENOLPIRUVICAS (PEPCKs) DE *E. coli* Y *S. cerevisiae*.** (Identification of reactive histidine residues in phosphoenolpyruvate carboxykinases from *E. coli* and *S. cerevisiae*). **MONTECINOS, L., \*BAZAES, S., \*GODOY, N., CARDEMIL, E. y JABALQUINTO, A.M.** Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile y \*Departamento de Química, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.

Las PEPCKs de levaduras y de otros microorganismos catalizan la descarboxilación y fosforilación de oxaloacetato en presencia de ATP para generar fosfoenolpiruvato, ADP y CO<sub>2</sub>. Como parte de una investigación dirigida a obtener información estructural de las PEPCKs dependientes de ATP se estudia la reactividad de los residuos de histidina en las enzimas de *E. coli* y *S. cerevisiae* frente al dietilpircarbonato (DEPC). Ambas enzimas se inactivan al incubarlas con DEPC, siendo la inactivación protegida por los sustratos ADP o PEP en presencia de Mn<sup>2+</sup>. Muestras de las dos PEPCKs modificadas con [<sup>14</sup>C]-DEPC se carboximetilaron y se trataron con tripsina. De ambas enzimas se aisló un péptido protegido por los sustratos. La secuenciación del péptido obtenido de la PEPCK de *E. coli* reveló que el residuo modificado es His<sup>269</sup>, que corresponde a un aminoácido conservado en todas las PEPCKs dependientes de ATP, ubicado en una región altamente conservada de la proteína. Se trabaja en la identificación del residuo modificado en la PEPCK de levadura.

Financiado por DICYT-USACH, FONDECYT 1941073 y DIUMCE QM94/3.

**20 - CARACTERIZACION PARCIAL DE PEROXIDASAS DE PARED CELULAR DE COLEOPTILOS DE *Avena sativa* L.** (Partial characterization of cell wall peroxidases from *A. sativa* L coleoptiles). **GONZÁLEZ, L.F.; ROJAS, M.C. y PÉREZ, F.** Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las peroxidasas (Pxs, EC 1.11.1.7) de plantas son glicoproteínas hemínicas presentes en la pared celular -así como en otros compartimentos celulares- donde catalizan la polimerización oxidativa de fenoles en presencia de  $H_2O_2$ . Dado que estos fenoles se hallan unidos por enlaces éter o éster a los polisacáridos de pared, la actividad peroxidativa disminuye la libertad de movimiento en la pared y conduce al entrecruzamiento y rigidización de la misma. Más aún, estas enzimas son capaces de generar el  $H_2O_2$  necesario para la reacción polimerizante, a partir de NADH y  $O_2$ . Las Pxs se encuentran unidas a la pared débilmente por enlaces iónicos (fracción iónica, FI), o bien atrapadas firmemente en su estructura de polisacáridos (fracción covalente, FC). Además, en ambas fracciones, las Pxs están representadas en una variedad de isoenzimas distinguibles por su punto isoeléctrico. Así entonces, nos ha interesado estudiar esta heterogeneidad de Pxs en relación a los procesos mediados por la enzima en la pared y que afectan su extensibilidad. En una primera etapa, se han aislado paredes celulares de coleoptilos de Avena en sucesivos lavados con Tritón X-100®, libres de otros contaminantes celulares que regularmente se extraen con las paredes y que presentan actividad de peroxidasa (membranas plasmáticas, mitocondriales y de retículo endoplásmico). A partir de estas paredes se ha extraído una FI y una FC al tratarlas con KCl 1M y una mezcla de celulasa y pectinasa, respectivamente. Las Pxs de ambas fracciones que representan entre un 0,1 - 0,5 % del total de actividad peroxidasa en el coleoptilo, se han caracterizado cinéticamente tanto en la oxidación de NADH como en la peroxidación de sustratos fenólicos naturales. La velocidad de oxidación de NADH en ambas fracciones es cerca de 50 veces menor con respecto a la peroxidación de ác. ferúlico o coumárico, pero es notablemente estimulada en presencia de estos fenoles. En estas condiciones, la FC es estimulada 5 a 10 veces menos que la FI. Más aún, en la reacción de peroxidación, la FC presenta una menor eficiencia catalítica con respecto a la FI en la utilización de ác. ferúlico y coniferil alcohol. Estos resultados, junto con diferencias en el patrón isoenzimático de ambas fracciones observado por isoelectroenfoque, indican que cada fracción cumpliría un papel distinto en el metabolismo de la pared y posiblemente que las peroxidasas iónicas son más importantes que el grupo de peroxidasas covalentes en la oxidación de fenoles y producción de  $H_2O_2$  en la pared celular.

\* Financiado por proyecto Fondecyt 2950050/1995.

**21 - NUEVAS SEÑALES PARA CONOCIDOS MECANISMOS DE TRANSDUCCION EN *Trypanosoma cruzi*.** ( New signals for known transduction mechanisms in *T. cruzi*) **FLAWIÁ, M.M., y TORRES, H.N.** Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI). Universidad de Buenos Aires. Obligado 2940, (1428) Buenos Aires, Argentina.

En células de mamíferos, la L-arginina es metabolizada para producir óxido nítrico (NO). Tanto en células neurales como en las endoteliales donde se origina y, en las células vecinas, el NO activa las guanilil ciclasas solubles como mensajero intracelular o intercelular. Todas las evidencias evolutivas indican que los mecanismos de transducción de señales que involucran al NO son operativos solamente en eucariotes superiores.

En extractos de epimastigotes del protozoario *Trypanosoma cruzi* se identificó y purificó una actividad enzimática de NO sintasa con las mismas características que las de mamíferos. La enzima convierte L-arginina en citrulina y NO. Tiene como requerimiento NADPH, es activada por tetrahidrobiopterina, FAD y  $Ca^{2+}$ -calmodulina e inhibida por n-metil arginina. *In vivo*, la producción de NO es activable por glutamato y por N-metil-D-aspartato (NMDA). Esta última observación, que indica la presencia de receptores de NMDA en *T. cruzi* es la primera realizada en una célula distinta de las del sistema nervioso central (SNC). La estimulación por NMDA puede ser bloqueada por EGTA, MK-801, ketamida e incrementada por glicina.

En preparaciones solubles de epimastigotes se demostró, *in vitro* la presencia de la enzima guanilil ciclasa activable por nitroprusiato. L-glutamato, N-metil-D-aspartato y nitroprusiato de sodio aumentan los niveles intracelulares de GMP cíclico. Se obtuvo una unión específica de MK-801 a membranas de epimastigotes de *T. cruzi*. La interacción es estimulada por glicina o serina y desplazada por ketamina. Estas observaciones indican que en *Trypanosoma cruzi*, tal como ocurre en SNC, el NO es el activador habitual de una guanilil ciclasa soluble. La NO sintasa estaría acoplada a un sistema de receptores de NMDA y/o glutamato responsables del transporte de iones calcio.

\*Parcialmente subsidiado por TDR-WHO e ICGEB-UNIDO.

**22 - NUEVAS FORMAS DE REGULACION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO EN CELULAS DIFERENCIADAS.** (Novel regulatory mechanisms of the epidermal growth factor receptor in differentiated cells) **FAÜNDEZ, V., WERNER E., y GONZÁLEZ, A.** Depto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Fac. Medicina, Depto. Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es una hormona polipeptídica cuyos efectos son mediados por un receptor (REGF) de superficie celular perteneciente a una familia de proteínas de transmembrana con actividad tirosina quinasa y vinculada a sistemas transduccionales involucrados en el control de la proliferación y diferenciación celular. El R-EGF y sus ligandos se encuentran ampliamente representados en distintas etapas del desarrollo y también en diversos tipos de células diferenciadas en el organismo adulto. En éstas últimas, se ignora tanto la función como los mecanismos de regulación del REGF.

Utilizando como modelos de estudio terminales sinápticas aisladas de cerebro y células de la granulosa de ovario en cultivo primario, ambos de rata, se presentarán evidencias de mecanismos de regulación relacionados con las particularidades fenotípicas de células diferenciadas, y no con mitogénesis. En la región sináptica, el REGF parece reciclar y su actividad de unión de ligando se modifica por depolarización. Detectamos, además, dos sustratos cuya fosforilación en tirosina es inducida por EGF y que desaparecen de esta región durante el desarrollo. En células de la granulosa se observó regulación de la expresión del REGF mediada por AMPc y sensible a actinomicina D. Esta forma de regulación parece ser célula-selectiva según los resultados comparativos obtenidos en líneas celulares establecidas.

(Financiamiento FONDECYT 1951132)

**23 - RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G Y ESTIMULACION DE LA VIA DE QUINASAS ACTIVADAS POR MITOGENOS. RECEPTOR MUSCARINICO DE OOCITO DE XENOPUS LAEVIS: UN EJEMPLO** (G-protein coupled receptors and MAPK simulation *Xenopus laevis* oocyte muscarinic receptor: an example). HERRERA, L., OLATE, J., Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Existen dos sistemas de transducción de señal que permiten la comunicación célula-célula: receptores tirosina quinasa (TKR) y receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Tradicionalmente ambos sistemas fueron considerados independientes uno del otro, pero recientemente este concepto ha cambiado completamente. Está claro hoy en día, que ambos sistemas pueden converger y regular vías idénticas. Así, activación de algunos GPCR provoca activación de la vía de transducción de señal propia para TKR por activación de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK). Los mecanismos moleculares implicados en esta regulación cruzada de vías es por interacción directa entre proteínas. El heterodímero  $\beta\gamma$ , con dominios WD40, al disociarse de la subunidad  $G\alpha$ -GTP, activa la quinasa intracelular Raf-1 y toda la cascada posterior de MAPK.

El receptor muscarínico de oocitos *Xenopus laevis*, recientemente clonado en el laboratorio, al ser expresado en células Cos-7 inhibe la actividad adenilil ciclasa a través de una proteína del tipo Gi y activa al mismo tiempo la vía de MAPK a través del heterodímero  $\beta\gamma$ .

Financiado por proyecto FONDECYT N° 1940256 y por proyecto DI Universidad de Concepción, 94.33.78.1.1.

**24 - REGULACIÓN DE LA EXOCITOSIS EN CÉLULAS CEBADAS POR PROTEINAS QUE LIGAN GTP Y  $Ca^{2+}$** . (Regulation of exocytosis in mast cells by GTP and  $Ca^{2+}$  binding proteins). OBERHAUSER, A.F. y FERNÁNDEZ, J. M. Centro de Estudios Científicos de Santiago, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Mayo Clinic, Rochester, MN, EEUU. Patrocinado por: Nancy Olea Rosson.

Los mecanismos moleculares que participan en el acoplamiento estímulo-secreción se han podido estudiar con gran detalle en células cebadas, usando la técnica del "patch-clamp". Usando este sistema hemos encontrado que el análogo no hidrolizable de GTP, GTP $\gamma$ S, introducido intracelularmente induce una fuerte respuesta secretora. La respuesta a GTP $\gamma$ S es acelerada por  $Ca^{2+}$  (>1  $\mu$ M), aunque  $Ca^{2+}$ , por sí solo, no es capaz de activar exocitosis. El efecto de GTP $\gamma$ S no depende de proteínas solubles, puesto que es posible estimular secreción después de perfundir el citosol por más de 20min con la pipeta de patch, y luego liberar GTP $\gamma$ S por fotólisis de "caged GTP $\gamma$ S". GTP es incapaz de estimular secreción en ausencia de  $Ca^{2+}$  (30nM), sin embargo es posible obtener una fuerte respuesta secretora cuando GTP se usa en presencia de  $Ca^{2+}$  (0.5 - 2  $\mu$ M). Estos resultados sugieren que la GTPasa que regula secreción en células cebadas requiere de una activación sostenida. Rab3 es una proteína dependiente de GTP homóloga a Ras, que se encuentra en vesículas secretoras. Hemos encontrado que péptidos sintéticos idénticos a la región en Rab3 que participa en la interacción con proteínas efectoras, son capaces de estimular secreción en células cebadas. Utilizando técnicas de biología molecular hemos logrado clonar dos isoformas de Rab3 en células cebadas: Rab3B y Rab3D. Nuestros resultados sugieren que una GTPasa de bajo peso molecular, homóloga a Rab3, forma parte de la maquinaria molecular que regula la exocitosis en células cebadas.

**25 - PROLIFERADORES PEROXISOMALES Y TRANSDUCCION DE SEÑALES** (Peroxisome proliferators and signal transduction) BRONFMAN, M., PONCE, C., BURZIO, V., DABIKE, M., e HIDALGO, P. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P.Universidad Católica de Chile.

Entre los efectos pleiotrópicos inducidos por agentes proliferadores peroxisomales con actividad hipolipidemiante (HPPs), se encuentra el aumento del contenido celular de muchos metabolitos, entre ellos, los acil-coenzimas A (acil-CoAs) de ácidos grasos. Cambios en la concentración de estos metabolitos junto a la formación de ésteres estables de acil-CoA de HPPs pueden alterar las vías de transducción e inducir efectos a largo plazo de estos xenobióticos. Tanto los acil-CoA naturales como los derivados del metabolismo de HPPs (HPPs-CoAs) pueden activar a proteína quinasa C (pkC) *in vitro*. Además, la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (un sustrato de pkC) en hepatocitos aislados es estimulada por Ciprofibrato (HPP). Hemos postulado que la activación de pkC por ciprofibrato-CoA puede ser responsable de este efecto. Los miembros de la familia pkC son quinasa cuya actividad depende de fosfolípidos, particularmente fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DAG) y, en algunos casos, Calcio. PkC esta presente en su forma inactiva en el citosol. Después de su estimulación, la enzima es translocada a la membrana, un fenómeno que podría ser iniciado por la liberación de DAG. Sin embargo, DAG se encuentra sólo transitoriamente en la membrana y otros mecanismos podrían dar cuenta de la regulación de la translocación de pkC a membranas y de los efectos a largo plazo de la quinasa. En contraste con la activación de pkC por ésteres de forbol, potentes agentes promotores tumorales, que pueden sustituir a DAG, la activación de pkC por acil-CoA y HPPs-CoA requiere la presencia simultánea de PS y DAG (o un éster de forbol). El mecanismo que da cuenta de la activación de pkC por acil-CoA involucra una disminución en el requerimiento de PS por la enzima. Dado que PS está en la membrana, es posible que acil-CoAs puedan estar facilitando la interacción de pkC con membranas *in vivo*. Apoyando esta hipótesis, hemos encontrado que acil-CoAs aumentan la fracción de pkC unida a la membrana en plaquetas humanas permeabilizadas con digitonina así como también aumentan la unión de pkC, purificada de cerebro de rata, a membranas de eritrocitos. De esta manera, es posible que la cantidad de pkC unida a membrana, la cual es fácilmente accesible a la activación por DAG luego de estimular la célula, puede estar aumentada en células tratadas con HPPs. Además, estudios preliminares con células promielocíticas HL-60, que pueden ser inducidas a diferenciar a macrófagos por ésteres de forbol (PMA), muestran que el ciprofibrato, un HPPs modelo, es capaz de inducir diferenciación, pero solo en presencia de cantidades subóptimas de PMA, las que por sí solas no inducen diferenciación. Este resultado puede interpretarse en términos de un aumento de pkC en la membranas inducido por ciprofibrato, pero que solo se manifiesta cuando se activa la quinasa por PMA.

(Financiado por Fondecyt 685-94)

**26 - PARTICIPACION DE CALCIO EN LA RESPUESTA DE DEFENSA DE *Citrus limon* A LA INOCULACION CON *Alternaria alternata*** (Participation of calcium in the *Citrus limon* defense response to inoculation with *Alternaria alternata*) <sup>1</sup>CASTAÑEDA, P. y PÉREZ, L. M. Dep. Bioquímica y Biología Molecular., Fac. Ciencias. Químicas Farmacéuticas, Universidad de Chile y <sup>1</sup>Dep. Biología, Facultad de Ciencias, UMCE.

Las plántulas de *C. limon* desarrollan una respuesta de hipersensibilidad frente a *A. alternata* y otros elicitores, sin embargo, se desconoce si existe participación de  $Ca^{2+}$  en la transducción de la señal generada por éstos. Se estudió la participación de  $Ca^{2+}$  en plántulas dañadas mecánicamente, a las que se les adicionó este ion en presencia y ausencia de EGTA, norarmepavina, verapamil; o bien, el ionóforo de calcio A23187 u otros metales bivalentes. La respuesta de defensa se analizó cuantificando la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima que se induce durante la reacción de hipersensibilidad.

Los resultados muestran que el  $Ca^{2+}$  adelanta en una hora la respuesta defensiva, su efecto es suprimido por EGTA y bloqueado por verapamil y norarmepavina. El ionóforo de calcio A23187 simula el efecto de  $Ca^{2+}$ , el que no puede ser imitado por iones como el  $Mg^{2+}$  o el  $Ba^{2+}$ .

Estos antecedentes sugieren que el  $Ca^{2+}$  participa en la transducción de la señal generada por los elicitores, con participación de canales de calcio.

Financiamiento FONDECYT 1940441.

**27 - CONSTRUCCION DE UN GEN DE CECROPINA, UN PEPTIDO BACTERICIDA DE INSECTO Y SU EXPRESION EN *Escherichia coli*.** (Construction of a cecropin gene, a bactericidal peptide derived from an insect, which is expressed in *Escherichia coli*). CÁ CERES, S., GÓ MEZ, I. y VENEGAS, A. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Uno de los mecanismos de defensa de los insectos frente a agresiones bacterianas es la producción de péptidos bactericidas. El objetivo final del proyecto es utilizar uno de estos péptidos como control biológico de plagas bacterianas que afectan cultivos de papas.

El péptido cecropina presente en la hemolinfa del gusano gigante de seda *Hyalophora cecropia* presenta acción bactericida por su incorporación en la membrana interna bacteriana, generando poros y produciendo lisis. A pesar de este efecto, se pretende expresar este gen en *E. coli*. Para ello se recurrió a un sistema inducible y controlable como los vectores tipo pET.

A partir de un plásmido con el cDNA de cecropina SB37, se amplificó la región codogénica via PCR con dos oligos: cec-1, con un sitio NcoI en el extremo amino terminal, incorporando una Met, como N-terminal y reemplazando Pro<sub>2</sub> por Ala<sub>2</sub>, y cec-2, que introduce un sitio BamHI. El gen amplificado se incorporó en el vector pET11d entre los sitios NcoI y BamHI. Este vector deja el gen clonado bajo el control del promotor T7, contiene el operador lac y además, el gen del represor lac, por lo que este sistema tiene la actividad transcripcional muy controlada. El gen solo se expresará en una cepa de *E. coli* que contenga el gen de la RNA polimerasa T7 (Ej. BL21[DE3]) y bajo inducción de IPTG. Luego de ligar el gen de cecropina al vector, se transformó *E. coli* BL21[DE3].

Al analizar un cultivo de este recombinante en crecimiento exponencial y luego de inducción con IPTG 1mM, se observó que la bacteria reducía su crecimiento. Sin embargo, el péptido no fue detectable en lisados bacterianos mediante Western blot.

Se concluye que las bacterias, luego de inducción, producen un nivel muy bajo de cecropina, la cual, por su efecto bactericida, impide una mayor producción del tóxico y éste no es detectable en las condiciones ensayadas. A futuro se propone expresar este gen en una bacteria resistente al péptido bactericida, o bien, en un sistema genético que permita su exportación al medio externo.

Financiado por proyecto FONDECYT # 1940713.

**28 - ANALISIS MOLECULAR DE GENES DE LA FENILALANINA AMONIO LIASA EN *Citrus limon*** (Molecular analysis of phenylalanine ammonia-lyase genes of *Citrus limon*) SEELENFREUND, D., NAVARRRO, J.<sup>1</sup>, LUXORO, C.<sup>1</sup>, LOBOS, S., CIFUENTES, V.<sup>2</sup>, PÉREZ, L. M. Dep. Bioq. Biol. Mol., Fac. Cs. Quím. Farm., <sup>1</sup> Dep. Biol. Cel y Gen., Fac. Medicina, <sup>2</sup> Dep. Cs. Ecol., Fac. Ciencias, Univ. de Chile.

La fenilalanina amonio liasa (PAL) se induce en *C. limon* en respuesta a la infección por patógenos. En las especies estudiadas, la PAL está codificada por una familia de genes. La PAL de *C. limon* se encuentra en el citosol, y sus genes son nucleares, pero no se conoce si éstos se encuentran dispersos o agrupados en una zona discreta del genoma.

Esta interrogante se ha abordado a través de: a) análisis de DNA de *C. limon*, mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE) e hibridación con sondas de PAL, b) análisis cariológico de *C. limon*, e hibridación *in situ* con sondas de PAL, y c) secuenciación de un clon cDNA de PAL de *C. limon*.

Los resultados muestran: hibridación de una sonda de PAL a más de un fragmento cromosómico, obtención del cariotipo de la variedad de *C. limon* utilizada en el laboratorio y una alta homología en la zona NH<sub>2</sub>-terminal de PAL de *C. limon* con PAL de otras especies.

Financiamiento FONDECYT 1940441.

**29 - EFECTO DE LAS DROGAS NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL SOBRE LOS NIVELES DE LOS TIOLES REDUCIDOS GLUTATION Y TRIPANOTION EN *Trypanosoma cruzi*** (Nifurtimox and benznidazole effect upon the concentrations of reduced glutathione and trypanothione in *T. cruzi*). REPETTO Y., OPAZO E., MAYA I.D., y MORELLO A. Departamento de Bioquímica. Fac. de Medicina, Univ. de Chile. Casilla 70086. Stgo 7 Chile.

La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, la sufren aproximadamente 20 millones de personas y más de 100 millones están expuestas. Glutación (GSH), tripanotión T(SH)<sub>2</sub> y glutationilespermidina (GSH-SP) son los tioles libres más abundantes en los tripanosomatidos y protegen a las células del daño por radicales libres. Tripanotión es sintetizado a partir de GSH y espermidina. Las concentraciones de GSH, T(SH)<sub>2</sub> y GSH-SP fueron determinadas en las cepas Tulahuén y LQ y el clon DM28c por reacción con monobromobimano y posterior separación por HPLC. Los tioles totales expresados como nmoles de GSH/g peso fresco fueron 562, 955 y 1.365 para las cepas Tulahuén, DM28c y LQ respectivamente, siendo el tripanotión el de mayor concentración, con un 70-80% del total. El tratamiento con nifurtimox (NX) 10 µM o Benznidazol (Bz) 50 µM por dos horas redujo en forma apreciable la concentración de tioles, siendo el T(SH) el más afectado. El tratamiento con 5 µM butionina sulfoximina, un inhibidor de la síntesis de GSH, disminuyó la concentración de los tioles entre un 27% y un 53%. Es posible que metabolitos reducidos de NX y Bz se conjugen con GSH, T(SH)<sub>2</sub> y GSH-SP disminuyendo sus concentraciones y exponiendo al parásito al efecto de radicales libres y agentes electrofílicos exógenos o endógenos. La biosíntesis del glutatión es un importante blanco quimioterapéutico.

Fondecyt-Chile (N°1940474), DTI-B 3176 y SAREC.

**30 - CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DEL PLEGAMIENTO Y DESPLEGAMIENTO DEL HETERODIMERO DE TUBULINA.** (Characterization of folding and unfolding products of the tubulin heterodimer). RODRÍGUEZ, P. y MONASTERIO, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La tubulina es la proteína responsable de la formación de los microtúbulos. Está compuesta por dos subunidades, α y β que surgen de una duplicación génica y que poseen un alto grado de similitud de secuencia. Se desconocen los factores estructurales que determinan la formación de heterodímeros (αβ) y no homodímeros (αα o ββ). La tubulina tiene dos sitios para la unión de GTP, uno intercambiable (E) que participa en la regulación del ensamblaje de los microtúbulos y un sitio no intercambiable (N) cuya función no se conoce debido a la falta de un procedimiento para remover el nucleótido en forma reversible. Nuestro objetivo es caracterizar los factores que gobiernan el plegamiento y ensamblaje del heterodímero de tubulina y determinar la función y localización del sitio N del GTP.

En este trabajo se analizan las características de la reacción de replegamiento y re-ensamblaje de los monómeros de la tubulina, tras desnaturación con GuHCl 4,5 M, utilizando espectroscopia de fluorescencia, entrecruzamiento y filtración molecular de alta resolución. Se determinó que los residuos triptófano de la tubulina replegada se ubican en un ambiente apolar similar o igual al de la proteína nativa. Además se determinó que la integridad del sitio de unión del colorante fluorescente 1,8-anilino-naftalenosulfonato es recuperado en más de un 90% al replegar la tubulina. Entrecruzamiento con glutaraldehído de los productos de la reacción de replegamiento muestran que la mayoría de la proteína está formando complejos diméricos. Experimentos de replegamiento utilizando filtración molecular rápida, muestran que la especie mayoritaria que se obtiene es el heterodímero, el cual se autoasocia en especies de alto peso molecular que son múltiplos del heterodímero.

Estos resultados muestran la reversibilidad del plegamiento de la tubulina, así como el ensamblaje del heterodímero a partir de las subunidades desplegadas.

(Finaciado por FONDECYT, proyectos 1950556 y 2950001)

**31 - MODULACION DE LA LIBERACION OSCILATORIA DE CALCIO DESDE EL RETICULO SARCOPLASMATICO INDUCIDA POR CAFEINA.** (Modulation of caffeine-induced oscillatory calcium release in sarcoplasmic reticulum). PÉREZ, C.E., MARENGO, J.J.\*, BULL, R. e HIDALGO, C.\* Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, \*C.E.C.S. \*Becario Fundación Andes.

Diversos tipos celulares presentan cambios oscilatorios en los niveles de calcio citoplasmático, que podrían deberse a liberación oscilatoria de calcio desde reservorios intracelulares. En estudios previos demostramos que vesículas aisladas de retículo sarcoplasmático (RS) de músculo de conejo muestran liberación oscilatoria de calcio en respuesta a cafeína. Con el objeto de dilucidar los posibles mecanismos responsables de esta oscilación, hemos estudiado el efecto de moduladores de los canales sensibles a ryanodina sobre la liberación de calcio inducida por cafeína, y en paralelo, el efecto, de cafeína sobre canales únicos incorporados en bicapas planas.

Rojo de rutenio, un inhibidor específico del receptor de ryanodina (RyR) inhibe en forma dosis dependiente las oscilaciones de  $Ca^{+2}$  inducidas por cafeína. ATP, un activador de RyR, aumenta en rango milimolar la frecuencia de las oscilaciones de  $Ca^{+2}$ . Bajo condiciones de fosforilación del RS con PKA y CamK, se potenció la liberación inicial de  $Ca^{+2}$  inducida por cafeína; sin embargo, desapareció la liberación oscilatoria. Estos resultados indican que la modificación de la actividad del RyR modula el efecto de cafeína sobre este canal, por lo que la liberación oscilatoria de calcio se debería a una acción directa de cafeína sobre el RyR. Estudios de canal único avalan esta hipótesis, ya que cafeína induce cambios oscilatorios en la actividad del canal del RyR.

Financiado por proyectos FONDECYT 1930776 y 1940369

**32 - SECRECIÓN APICAL DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B (HBsAg) EN CELULAS EPITELIALES POLARIZADAS** (Apical secretion of the HBsAg in epithelial polarized cells). MARZOLO, M.P. BULL, P., y GONZÁLEZ, A. Depto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Fac. Medicina, Depto. Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Las células epiteliales polarizadas destinan proteínas distintas hacia rutas exocíticas apicales o basolaterales mediante mecanismos que involucrarían señales de destinación y receptores intra-celulares. Hasta el momento estos elementos de destinación se desconocen para proteínas de secreción. Esta tesis aborda el problema utilizando como modelo la expresión del cDNA del HBsAg en distintas células polarizadas, cultivadas en cámaras Millicell o Transwell. El HBsAg forma partículas lipoproteicas que son secretadas apicalmente en células MDCK. Hemos realizado mutagénesis sitio dirigida sobre un pequeño segmento hidrofílico rico en prolina y cisteínas que estaría en la superficie de estas partículas. Se modificaron inicialmente tres de las prolina y el único residuo de asparragina (Asn 146 por Tyr) que se glicosila. El HBsAg mutante no glicosilado mostró una polaridad apical de secreción semejante al nativo, tanto en células MDCK como en células Fisher. Este resultado contradice la hipótesis más reciente (Fiedler y Simons, Cell 81:309, 1995) que adjudica un papel de señal y receptor apical a N-glicanos y a lectinas, respectivamente. Por otro lado, la secreción del HBsAg podría estar acoplada a la destinación apical de proteínas ancladas a la membrana por un tallo de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Sin embargo, esto es poco probable por los resultados obtenidos en las células Fisher, que destinan estas proteínas basolateralmente, y por experimentos de inhibición de la síntesis del tallo GPI por manosamina.

Financiamiento FONDECYT 1940709 y 1951132.

**33 - ESTUDIO DE LA ORGANIZACION Y EXPRESION DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE *Solanum tuberosum*.** (Study of *Solanum tuberosum* mitochondrial genome organization and expression). ZANLUNGO, S., QUIÑONES, V. y JORDANA, X. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El genoma mitocondrial de plantas es mucho más grande y complejo que el de animales y hongos por lo que podría contener más genes. En los últimos años hemos estudiado la organización estructural y la expresión del genoma mitocondrial de la papa (*Solanum tuberosum*). En este trabajo se describe la identificación del gen que codifica para la proteína ribosomal S10 (rps10), gen que no ha sido descrito previamente en ningún genoma mitocondrial de angiospermas. El gen rps10 se organiza en dos exones de 307 y 80 pb separados por un intrón de grupo II de 774 pb.

En mitocondrias de plantas superiores se ha descrito recientemente el fenómeno de la edición del RNA mensajero: una modificación postranscripcional que consiste principalmente en cambios C a U, siendo el mecanismo desconocido. La edición del RNA es una etapa muy importante en la expresión del genoma mitocondrial ya que los cambios nucleotídicos se encuentran en regiones codificantes y dan origen a cambios en la secuencia aminoacídica respecto a la esperada de la secuencia del gen.

El estudio de la edición de los transcritos de rps10 permitió establecer que los codones de terminación de la traducción y probablemente de iniciación son creados por edición del mRNA y que existen 3 eventos de edición adicionales, 2 en la parte codificante (que cambian la identidad del aminoácido) y uno en el intrón. Este último aumenta la estabilidad de la estructura secundaria del intrón y podría ser esencial para la reacción de splicing.

Por otra parte, se analizó la edición de los transcritos de un gen previamente descrito en nuestro laboratorio: el gen cob, que codifica para el apocitocromo b. Se estableció que en el mRNA del gen cob de papa se producen 9 cambios C a U, todos los cuales darían lugar a cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína. De esta manera, en la proteína codificada de 393 aminoácidos habría 9 posiciones en que la secuencia de aminoácidos diferiría respecto a la del gen. La mayoría de estos cambios tienden a hacer más conservada la proteína cuando se la compara con la de especies no vegetales.

Los resultados obtenidos para rps10 y cob confirman la importancia de la edición del RNA como un mecanismo de mantención de la secuencia aminoacídica de las proteínas y de generación de proteínas funcionales (creación de codones de inicio y término de la traducción) en los organismos vivos.

(Financiado por proyectos Fondecyt 93-0584, CCE C11\*-CT93-0058 y una beca de doctorado Conicyt a S. Z.)

**34 - MODULACION DE CANALES DE CALCIO DE TELENCEFALO DE RATA SENSIBLES A RYANODINA.** (Modulation of ryanodine-sensitive calcium channels derived from rat telencephalon). MARENGO, J.J.\*, HIDALGO, C.\* y BULL, R. Depto. Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. \*Becario Fundación Andes, \* C.E.C.S.

En el sistema nervioso central la concentración citoplasmática de calcio es crucial en una serie de procesos fisiológicos y patológicos. Los receptores de ryanodina forman canales de calcio que permiten la liberación de  $Ca^{2+}$  desde reservorios intracelulares. Con el propósito de estudiar estos canales hemos purificado retículo endoplasmático de telencefalo de rata siguiendo distintos marcadores bioquímicos. La fusión de éste con bicapas planas reveló canales sensibles a ryanodina con  $\gamma \approx 100$  pS.

En los canales únicos estudiados (n=15) se observaron tres perfiles de modulación por calcio citoplasmático libre. Nueve canales mostraron escasa activación por  $Ca^{2+}$  citoplasmático, y su tiempo fraccional abierto ( $P_o$ ) no sobrepasó 0,1. De los seis canales restantes, que presentaron importante activación por  $Ca^{2+}$ , la mitad se bloqueó al aumentar el  $Ca^{2+}$  a 0,5 mM, mientras que los otros tres no mostraron bloqueo en esa condición. Otros moduladores fisiológicos también mostraron efecto diferencial. Así, ATP activó los canales no bloqueables en concentraciones micromolares, requiriéndose concentraciones milimolares para activar los canales poco sensibles a calcio. Calmodulina (CAM) fue capaz de activar de manera dosis dependiente un canal bloqueable, pero no tuvo efecto sobre canales poco sensibles a calcio, los que sí aumentaron su  $P_o$  en presencia de CAM y ADP ribosa cíclica. Nuestros resultados muestran que el retículo endoplasmático del telencefalo de rata presenta canales de  $Ca^{2+}$  con diferentes perfiles de activación, los que podrían cumplir diferentes roles celulares.

Financiado por proyectos FONDECYT 1930776 y 1940369.

**35 - EFECTO DE DIABETES SOBRE EL TRANSPORTE DE NUCLEOSIDOS Y SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO EN ENDOTELIO HUMANO EN CULTIVO** (Effect of diabetes on nucleoside transport and nitric oxide synthesis in cultures of human endothelium). SOBREVIA, L., MANN, G.E., YUDILEVICH, D. L. 1 Fisiología y Biofísica, Fac. de Medicina, Universidad de Chile. 2 Vascular Biology Research Centre, King's College, University of London, U.K.

En diabetes mellitus hay alteraciones de la función endotelial, vasodilatación generalizada e hipertensión capilar, y como complicación del embarazo esta enfermedad afecta al feto. En trabajo estudiamos el transporte y metabolismo de adenosina (Sobrevia, L. et al. Am. J. Physiol. 267:C39-C47, 1994) y L-arginina (Sobrevia et al. J. Physiol. en prensa) en endotelio fetal humano. Células endoteliales fueron aisladas y cultivadas (pasaje 3) de vena umbilical obtenida de gestaciones normales (HUEVEC-N) y complicadas por diabetes (HUEVEC-D). HUEVEC-D logran 100% confluencia en 7-8 días comparado con 4-5 días en HUEVEC-N. En HUEVEC-D hubo una disminución de la incorporación de  $[^3H]$ timidina y L- $[^3H]$ leucina. El transporte de adenosina fue sensible a nitrobenziltioinosina y otros nucleósidos, pero no a nucleobases; y fue menor en HUEVEC-D ( $V_{max} 260 \pm 40$  pmol ( $\mu g$  proteína) $^{-1} s^{-1}$ ) comparado con HUEVEC-N ( $V_{max} 600 \pm 70$ ). En HUEVEC-N los principales metabolitos de adenosina fueron compuestos nucleofosforilado (XNP, 95%), en cambio en HUEVEC-D se detectó un 45% XNP y acumulación de adenina y adenosina en extractos celulares. En HUEVEC-D el transporte de L-arginina fue mayor ( $V_{max} 9.9 \pm 0.5$ ) pmo ( $\mu g$  proteína) $^{-1} min^{-1}$ ) que en HUEVEC-N ( $V_{max} 4.6 \pm 0.13$ ). Por patch-clamp determinamos que HUEVEC-D presentaron un hiperpolarización de membrana ( $-78 \pm 0.3$  mV) comparado con HUEVEC-N ( $-70 \pm 0.4$ ). La síntesis basal de óxido nítrico fue mayor en HUEVEC-D ( $2.5 \pm 0.4$ ) pmo ( $10$  células) $^{-1} 5 min^{-1}$ ) comparada con HUEVEC-N ( $1.0 \pm 0.2$ ). La secreción basal y estimulada de  $PGI_2$  fue menor en HUEVEC-D comparado con HUEVEC-N. Las alteraciones en el endotelio de madre diabética podrían deberse a cambios genéticos inducidos por la hiperinsulinemia fetal que acompaña la diabetes gestacional.

Financiado: FONDECYT, The Wellcome Trust, British Council.

**36 - ACTIVACIÓN DEL COTRANSPORTADOR DE KCl POR AGUA OXIGENADA ( $H_2O_2$ ).** (Activation of K-Cl cotransport by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )). BIZE, I. y DUNHAM, P. B. Department of Biology, Syracuse University, Syracuse, NY, USA.

El cotransporte de KCl participa en la regulación de volumen de varios tipos de células. Este sistema es activado cuando aumenta el volumen celular, como resultado de la inhibición de una quinasa sensible a cambios de volumen. El cotransportador de KCl también puede ser activado sin cambios iniciales en el volumen celular, por estaurosporina (un inhibidor de quinasas) y por agentes oxidantes. Investigamos el efecto de  $H_2O_2$ , un oxidante débil, en el cotransporte de KCl en glóbulos rojos de oveja, en un intento de identificar los blancos moleculares de este oxidante. También estudiamos el efecto de  $H_2O_2$  en células tratadas con estaurosporina en un intento de elucidar el sistema de transducción de señales que regula la actividad de este transportador. Observamos estimulación del cotransporte por  $H_2O_2$  en células con catalasa intracelular activa lo que sugiere que el sitio sensible a  $H_2O_2$  es inaccesible a catalasa y está probablemente localizado en la membrana. En células tratadas con azida (un inhibidor de catalasa), la estimulación por  $H_2O_2$  requirió menos  $H_2O_2$  pero el grado de estimulación máxima fue similar al de células control, sugiriendo que hay un solo sitio sensible a este oxidante. La estimulación del cotransporte por  $H_2O_2$  fue abolida por caliculina, un inhibidor de las fosfatasa serina/treonina de tipo 1 y 2A. La estimulación por  $H_2O_2$  fue aditiva con la estimulación por estaurosporina, sugiriendo que el mecanismo de activación por  $H_2O_2$  es diferente al mecanismo de activación por estaurosporina, indicando que el  $H_2O_2$  no actúa a través de la inhibición de la quinasa sensible a estaurosporina. Los datos sugieren que la activación del cotransporte de KCl por  $H_2O_2$  ocurre a través de la estimulación de una fosfatasa sensible a caliculina localizada en la membrana del glóbulo rojo y que la activación del cotransporte es el resultado de una disminución en la fosforilación del transportador o un regulador. Postulamos un modelo de transducción de señales para la activación del cotransporte de KCl que incluye una fosfatasa sensible a caliculina y a oxidantes, y regulada por fosforilación.

**37 - INSULINA ESTIMULA LA FOSFORILACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA Y DEL CITOESQUELETO DEL ERITROCITO HUMANO.** (Insulin stimulates phosphorylation of red cell membrane and cytoskeletal proteins). ORTOLANI, O., ROSENMAN, E., y CANESSA, M. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago

Las proteínas de la membrana (MB) del eritrocito (ERIT) se han caracterizado por su peso molecular y su grado de fosforilación (FOSF), pero no se conocen agonistas fisiológicos que regulen la FOSF. La estimulación por insulina del intercambio de Na por H en ERIT humanos, nos llevó a estudiar su efecto en la FOSF de proteínas de MB. ERIT de sujetos que ayunaron por 12 h, se incubaron por 2 h en buffer Krebs con  $75 \mu Ci/ml$  de  $p^{32}$  y luego por tiempos variables (2-45') con insulina ( $100 \mu U/ml$ ). También se estudió el efecto de inhibidores de fosfatasa (ácido okadaico y vanadato) y activación de quinasa C por forbol (PMA). Se prepararon MBs por lisis hipotónica y las proteínas se analizaron por electroforesis en geles de poliácridamida Fairbanks y fijación en ácido tricloro-roacético. Los geles se revelaron por radioautografía y otros se seccionaron en bandas para determinar su radioactividad.

La insulina aumentó (30-300%, n=7) rápidamente (2') la FOSF de varias proteínas del citoesqueleto (Bandas 1, 2, 4 y 5) y proteínas de transporte presentes en la Banda 3. El aumento de la FOSF fue máximo entre 2- 5' y decayó después de 15'. El efecto de la insulina es similar al de ácido okadaico pero de mayor magnitud (n=6). La inhibición de Tyr-fosfatasa por vanadato (n=4) provocó un aumento de la FOSF restringido a las Bandas 1 y 2. PMA aumentó significativamente (100%, n=4) la FOSF de las Bandas 3 y 4.

Los resultados sugieren que el receptor de insulina promueve la FOSF del citoesqueleto y de transportadores presentes en la Banda 3.

Financiado por Fondecyt 194-0339 y Fundación Andes



**38 - MATRIZ EXTRACELULAR Y BIOMINERALIZACIÓN DE LA CÁSCARA DEL HUEVO.** (Extracellular matrix and eggshell biomineralization). **FERNÁNDEZ, M.S.**, y **ARIAS, J.L.** Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

La cáscara del huevo de aves es una biocerámica compuesta, cuya formación está controlada por la interacción entre una fase orgánica y otra inorgánica. La fase orgánica contiene, entre otras macromoléculas, colágeno tipo X y proteoglicanos del tipo queratán y dermatán sulfato.

Entender los principios que gobiernan la síntesis y distribución temporo-espacial de tales macromoléculas y su influencia sobre la organización de la fase cristalina, es un aspecto esencial para establecer las bases biológicas de la calidad de la cáscara ya sea como cámara embrionaria o como envase natural del producto huevo.

Mediante el análisis inmunohistoquímico e inmunoultraestructural se siguió el proceso de formación de la cáscara del huevo, estableciéndose los sitios tisulares y los períodos de tiempo precisos del depósito de macromoléculas particulares. El colágeno tipo X se detecta desde el primer momento de la formación de las membranas no mineralizadas de la cáscara. La aparición de queratán sulfato es coincidente con la aparición de las mamilas, mientras que el dermatán sulfato aparece posteriormente y de manera coincidente con el depósito de matriz de la cáscara. Esta matriz tiene efectos notables sobre la morfología de los cristales de carbonato de calcio al ensayar su efecto sobre la precipitación de calcita *in vitro*.

Dada la precisa localización, aparición temporal y particular afinidad por calcio, se propone que el queratán sulfato estaría relacionado con la nucleación de los primeros cristales de calcita y con la mantención de una estructura particular, los cuerpos de reserva de calcio, que son la fuente primaria de calcio para el embrión. Por otra parte, el dermatán sulfato estaría relacionado con el crecimiento y establecimiento de la orientación preferencial de los cristales de calcita que constituyen las columnas de la capa en empalizada.

Financiado parcialmente por Proyecto No. 1931136 de FONDECYT y por el Depto. de Postgrado de la Universidad de Chile.

**39 - ¿POTENCIA LA ACETILCOLINESTERASA LA TOXICIDAD DEL PÉPTIDO  $\beta$ -AMILOIDE?** (Does Acetylcholinesterase potentiate the toxicity of the  $\beta$ -amyloid peptide?). **CALDERÓN, F.\*** e **INESTROSA, N.C.** Depto de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile.

La enfermedad de Alzheimer es una patología neurodegenerativa caracterizada por la formación de placas neuríticas, ovillos neurofibrilares y muerte neuronal. Esta última afecta principalmente a los sistemas neuronales involucrados en memoria, incluyendo el sistema colinérgico. La muerte neuronal se correlaciona fuertemente con los depósitos extracelulares de  $\beta$ -amiloides (A $\beta$ ).

Se ha demostrado que el péptido A $\beta$  tiene por sí solo un efecto neurotóxico, y que el grado de toxicidad depende de su estado de agregación. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la enzima acetilcolinesterasa (AChE) modula la agregación del A $\beta$ .

Hemos iniciado estudios que nos permitirán definir el papel de la AChE en la toxicidad provocada por el A $\beta$ , como también explorar la posible actividad tóxica de la enzima. Para ello utilizamos la forma G<sub>1</sub> de la enzima cerebral y péptidos mutantes del A $\beta$  que poseen mayor o menor capacidad de agregación. Los estudios se realizaron en células neuronales PC12 y Neuro2A, las que muestran distintos grados de sensibilidad a diversos agentes tóxicos. La toxicidad fue medida por medio del ensayo de MTT y la liberación de LDH. Utilizando el péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub>, fragmento de A $\beta$  que posee la actividad neurotóxica, hemos encontrado que las células Neuro2A, menos sensibles al daño por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muestran insensibilidad al A $\beta$  respecto a células PC12. Además ambas líneas celulares son altamente sensibles a una actividad tóxica dependiente de la AChE cuando ésta se aplica al medio de cultivo. Nuestros resultados sugieren que la enzima AChE además de potenciar la toxicidad del A $\beta$  podría tener un efecto neurotóxico *per se*.

(Financiado por FONDECYT N° 1940694. \*Instructor Becario VRA-PUC)

**40 - REGULACION POST-TRADUCCIONAL DE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE HIERRO EN CELULAS CACO-2.** (Post-translational regulation of intracellular iron concentration in Caco-2 cells). **ARREDONDO, M.**, **TAPIA, V.** y **NÚÑEZ, M. T.** Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Los niveles corporales de Hierro (Fe), están regulados por su absorción a nivel de intestino delgado, el enterocito actúa como una barrera selectiva, permitiendo el paso de Fe a la circulación en cantidad equivalente a las pérdidas y necesidades corporales. En su regulación intracelular actúan la ferritina (Fn) que lo secuestra y los receptores de transferrina (RTf) que participan en su internalización. La expresión de ambas proteínas está regulada traduccionalmente por la proteína que responde a Fe (IRP). Con la hipótesis que el nivel intracelular de Fe regula su paso hacia la circulación, cuantificamos elementos regulados por IRP.

Células Caco-2 cultivadas con concentraciones crecientes de Fe mostraron una acumulación intracelular de Fe no lineal y que se relaciona directamente con el aumento en la concentración intracelular de Fn e inversamente con el número de RTf basolaterales. La IRP, muestra actividad de unión a rRNA a concentraciones intracelulares de Fe < de 100  $\mu$ M. A concentraciones mayores, la actividad de IRP cesa brusca-mente, lo que se relaciona con un aumento en la síntesis de Fn.

Postulamos que la internalización de Fe a través de la endocitosis basolateral de ferrotansferrina forma parte del sistema sensor del Fe sistémico. La ganancia de Fe sistémico por este sistema regula la expresión de Fn a través de la actividad de IRP. Un aumento en la concentración de Fn intracelular, es la barrera principal de paso transepitelial de Fe.

Financiado por FONDECYT N° 1940568

**41 - CLONAMIENTO Y EXPRESION DE FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE RIÑON DE CERDO EN *Escherichia coli*.** (Cloning and expression of pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase in *Escherichia coli*). **CÁRCAMO, J.G.**, **LEÓN O., REYES, A.M., & SLEBE, J.C.** Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

La fructosa-1,6-bisfosfatasa es una enzima clave en la regulación de la gluconeogénesis. Todas las fructosa-1,6-bisfosfatasa de mamíferos son homotetrámeros, cuyas actividades (fructosa-1,6-bisfosfato  $\rightarrow$  fructosa-6-fosfato + Pi) son inhibidas alostéricamente por AMP. Estudios de modificación química y de su estructura tridimensional, determinada por difracción de rayos X, han implicado varias cadenas laterales de aminoácidos en los sitios activo y alostérico y en la mantención de la estructura cuaternaria de la enzima. Para investigar las relaciones estructura-función en esta proteína por mutagénesis sitio específica, nos propusimos clonar y expresar en *E. coli* a la enzima de riñón de cerdo. A partir de cDNA total de riñón de cerdo se amplificó el gen de la enzima mediante PCR, usando partidores adecuados que contenían los sitios de restricción Nde I y Bam HI. El DNA amplificado se insertó en el vector de expresión pET22b(+), luego de cortar con Nde I y Bam HI. Este DNA se usó para transformar células competentes de *E. coli* DH5<sub>2</sub>. El DNA de una colonia que presentó un inserto del tamaño esperado (1 kb), fue purificado y secuenciado; el fragmento de 1120 bp contiene la secuencia que codifica a la enzima de riñón de cerdo. El DNA plasmidial de esta colonia se purificó y se le empleó para transformar la cepa de *E. coli* DL 21 (DE3). Esta última es lisogénica para DE3, el cual codifica para T7 RNA polimerasa bajo el control de *lac* UV5, siendo posible inducir con IPTG la transcripción del cDNA insertado. Al inducir por 16 h a 30°C, se observó la expresión de una proteína de 37 kDa, valor que corresponde al informado para la bisfosfatasa, junto con la detección de altos niveles de actividad enzimática en extractos libres de células. Se obtuvo  $\pm$ 5-8 mg de proteína recombinante purificada por litro de cultivo. Esta enzima recombinante exhibe propiedades cinéticas idénticas a las de la fructosa-1,6-bisfosfatasa natural de riñón de cerdo.

(Financiado por proyectos: FONDECYT 1951215, DID-UACH S-94-10 y S-95-41)

**42 - HISTONA H1 E HISTONAS NUCLEOSOMALES EN DOS GENEROS DE LA FAMILIA Trypanosomatidae** (H1 histone and core histones in two genera of the Trypanosomatidae family). ESPINOZA, I.; TORO, G.C.; GALANTI, N. y HELLMAN, U. Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, U. de Chile y Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden.

La cromatina en tripanosomátidos presenta rasgos característicos, como ausencia de condensación en cromosomas durante la división. Para intentar comprender este comportamiento, se presenta una caracterización parcial de las histonas de *Crithidia fasciculata* y *Leishmania mexicana*, dos géneros de la familia Trypanosomatidae.

Se extrajeron histonas de cromatina de estos tripanosomátidos y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, comparando con histonas de timo de ternera, espermio de erizo de mar y *Trypanosoma cruzi*. En algunos experimentos, previo a la extracción de las histonas, la cromatina se lavó con NaCl 0.35 M para eliminar las proteínas HMG. Alternativamente se purificó la histona H1 por solubilidad diferencial y por HPLC en fase reversa; en esta proteína se determinó su composición aminoacídica. Una posible histona H1 de *C. fasciculata* se incubó con tripsina, se aislaron los péptidos y uno de ellos se analizó en secuenciador de aminoácidos.

*C. fasciculata* y *L. mexicana* presentan proteínas cromosomales con migración electroforética similar a histonas del núcleo nucleosomal de las otras especies analizadas. Además muestran proteínas cromosomales con movilidad electroforética, perfil de elución y composición de aminoácidos, similar a histona H1 de *T. cruzi*. El péptido secuenciado de posible histona H1 de *C. fasciculata* presentó homología con histona H1.

Considerando estos resultados y otros previos obtenidos con *Trypanosoma*, se propone que *Crithidia* y *Leishmania* presentan histonas del núcleo nucleosomal con divergencia marcada a la de eucariontes superiores. De manera similar, estos dos géneros muestran una histona H1 que corresponde probablemente a solo una región de la histona H1 de mamíferos.

Financiado por SAREC y FONDECYT-1940314.

**43 - DESNATURACION DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA POR CLORHIDRATO DE GUANIDINA.** (Denaturation of fructose-1,6-bisphosphatase by guanidine hydrochloride). REYES, A.M., LUDWIG, H. & SLEBE, J.C. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Las fructosa-1,6-bisfosfatasa de vertebrados son homotetrámeros cuya actividad (fructosa-1,6-bisfosfato  $\rightarrow$  fructosa-6-fosfato + Pi) es regulada alostéricamente por AMP. El tetrámero nativo presenta simetría  $D_2$ , vale decir, cada subunidad contacta dos subunidades vecinas a través de diferentes interfaces; una de ellas forma el sitio activo, mientras la otra está adyacente al sitio de AMP. Para testar si estas interfases pueden diferenciarse en términos de su estabilidad frente a agentes desnaturantes, caracterizamos la desnaturación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo con clorhidrato de guanidina (GdnHCl).

La desnaturación se estudió por determinaciones de actividad enzimática y de fluorescencia (intensidad, máximo de emisión, polarización), usando sondas intrínsecas (tirosinas) y extrínsecas (2-(4'-maleimidilanolino)naftalen-6-sulfonato (MIANS) y 5-(((2-iodoacetil) amino) etil)amino)naftalen-1-sulfonato (AEDANS)). MIANS y AEDANS se ubican en Cys-128, cercanas al sitio activo. Detectamos tres etapas de desnaturación sucesivas, basados en curvas de desnaturación no coincidentes: (i) la disociación del tetrámero nativo en dímeros ( $>0,4$  M GdnHCl), que implica la pérdida de la actividad catalítica, la exposición de MIANS a un ambiente acuoso y una disminución parcial de la polarización dependiente de la concentración de proteína; (ii) la disociación de dímeros en monómeros ( $>1$  M GdnHCl), que involucra la exposición de tirosinas al medio acuoso, disminución de la polarización y acumulación de un intermediario monomérico refractario a renaturación y, (iii) el desplegamiento de los monómeros ( $>2,2$  M GdnHCl), que se asocia a pérdida de polarización independiente de la concentración de proteína. Este esquema implica la disociación ordenada de las interfaces entre las subunidades y sugiere que en el tetrámero nativo la interface adyacente al sitio alostérico para AMP es más estable que la interface que forma el sitio activo.

(Financiado por proyectos: FONDECYT 1951215, DID-UACH S-94-10 y S-95-41)

**44 - MODIFICACION QUIMICA DE RESIDUOS DE CISTEINA E HISTIDINA POR EL REACTIVO K DE WOODWARD.** (Woodward's reagent K modifies both cysteine and histidine residues) BUSTOS, P., GAJARDO, M.I., GÓMEZ, C. y JABALQUINTO, A.M. Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile.

Se ha propuesto que el reactivo K de Woodward modifica residuos de aspártico y glutámico de enzimas con formación de un enol éster que absorbe a 340 nm. Otros autores indican que esta absorción se debe a aductos de WRK con residuos de cisteína, histidina, lisina o tirosina. La incubación de las carboxilasas fosfoenolpirúvicas (PEPCKs) de *E. coli* y *S. cerevisiae* resulta en una pérdida de la actividad enzimática y en la aparición de un cromóforo que absorbe a 340 nm. El mapa tríptico de las enzimas modificadas en ausencia de los sustratos permitió la aislación de péptidos que absorben a 340nm y que están ausentes al modificar las enzimas en presencia de los sustratos. La secuencia de los péptidos reveló que los residuos modificados corresponden a His<sup>231</sup> para la PEPCK de *E. coli* y a His<sup>356</sup> y Cis<sup>365</sup> para la enzima de levadura. Se discute la supuesta especificidad del WRK para los grupos carboxilos.

Financiado por DICYT-USACH y FONDECYT 1941073.

**45 - AISLAMIENTO DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR Pseudomonas spp.** (Isolation of bacteriocins produced by *Pseudomonas spp.*) HUBERT, E.,<sup>(1)</sup> BREVIS, P.,<sup>(2)</sup> LOBOS, O.<sup>(2)</sup> y PADILLA, C.<sup>(2)</sup> Dpto. de Ciencias Biológicas<sup>(1)</sup> y Area de Microbiología<sup>(2)</sup>, U. de Talca.

Actualmente existe gran interés en sustancias biodegradables que presenten actividad antimicrobiana sobre agentes patógenos.

A partir de 2 cepas de *Pseudomonas spp* se aislaron bacteriocinas con actividad sobre bacterias enteropatógenas. Se optimizaron las condiciones de crecimiento y producción de bacteriocinas de estas 2 cepas. Se cultivan las cepas y se aíslan las bacteriocinas del medio de cultivo mediante extracción con  $\text{CHCl}_3$  y cromatografía en Sephadex G-10. Las fracciones con actividad se analizan por electroforesis capilar y HPLC.

FONDECYT 1950417

**46 - PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE LAS ENZIMAS FERULOILESTERASA Y b-XILANASA Y SU APLICACION EN EL PRETRATAMIENTO ENZIMATICO DE PULPAS DE CELULOZA.** (Production and characterization of feruloilesterase and b-xylanase and its application in the enzymatic treatment of Kraft pulps.) AGUIRRE<sup>1</sup>, C., CASTILLO<sup>1</sup>, C., DURÁN<sup>2</sup>, N. y Curotto<sup>1</sup> E.<sup>1</sup>Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso. <sup>2</sup>Instituto de Química, Universidad Estatal de Campinas, Brasil. (Patrocinio: Dr. Gustavo González Lira).

Las enzimas b-xilanasas y feruloilesterasa en conjunto, podrían facilitar la remoción de lignina al pretratar enzimáticamente las pulpas de celulosa. A partir de un grupo de hongos chilenos, se aislaron las cepas xilanofíticas CP1 (*Penicillium canescens*) y 2M1 (*Aspergillus cervinus*), en ellas se indujeron, en un medio de cultivo sólido con 1% de xilano de avena, las enzimas feruloilesterasa (FE) y b-xilanasas (X). La actividad de FE se midió con el sustrato metilferulato, evaluando la liberación de ácido ferúlico por HPLC y la de X fue medida usando xilano de abedul como sustrato; los productos fueron evaluados midiendo cuerpos reductores.

Se caracterizó en ambos sistemas enzimáticos: temperatura, pH óptimo y estabilidad térmica, en ausencia de sustrato. Para la FE la inactivación a 45°C, sigue una cinética de primer orden doble exponencial, cuyas constantes son:  $k_1 = 0.206$  y  $k_2 = 3.850 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , en cambio la X presenta una inactivación de primer orden monoexponencial con una  $k_i$  de  $0.183 \text{ min}^{-1}$  y un tiempo de vida media de 3.78 min.

Con los extractos enzimáticos de la cepa CP1 se realizaron pretratamientos enzimáticos siguiendo una secuencia de blanqueamiento XD80Ep (enzima, dióxido de cloro, extracción alcalina-peróxido). En la pulpa pretratada y en los controles correspondientes se vio la disminución del índice kappa, evaluándose los parámetros de blancura, brillo y viscosidad, además de las características físicas del papel. Estas últimas no muestran diferencias con un papel obtenido en planta de celulosa con el método Kraft. El AOX medido en los efluentes mostró una disminución de un 40% en relación a pulpas no pretratadas. Con los extractos enzimáticos de la cepa 2M1 se evaluó la secuencia (FE.X)ZEP, totalmente libre de cloro con sus controles adecuados.

Los resultados de estos experimentos muestran un sinergismo entre estas enzimas, mejorándose los índices de preblanqueamiento comparados con las enzimas por separado y sus controles correspondientes.

Agradecimientos. Fund. Andes, Papelera Laja. DGI UCV.

**47 - EFECTO DEL pH EN LA ENTALPIA DE ACTIVACION DE LA b-GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS.** (Influence of pH on the enthalpy of activation of almond  $\beta$ -glucosidase). O'REILLY, S., WEBER, M. y PARIS, I. Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Química, Fac. de Cs. Bas. y Mat., Universidad Católica de Valparaíso. Patrocinio: Dr. G. González L.

Mecanismos de reacción con una menor energía libre de activación explican el aumento de la velocidad de las reacciones catalizadas en relación a las no catalizadas. La energía libre de activación tiene un componente entálpico y uno entrópico, siendo la entalpía de activación el parámetro que determina la variación con la temperatura de las constantes, parámetros cinéticos y de la velocidad de las reacciones. En reacciones enzimáticas, la temperatura afecta además las constantes de disociación de la enzima libre y del complejo enzima-sustrato. Esto se traduce, en valores de energías de activación ( $E_a$ ) y entalpías de activación que dependen del pH y que presentan un significado fundamentalmente operacional. La entalpía de activación, que caracteriza al sistema y que permite un mayor análisis, se puede obtener a partir de los parámetros cinéticos independientes del pH ( $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$ ).

En este trabajo hemos estudiado la entalpía de activación asociada a la hidrólisis del p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido catalizada por  $\beta$ -glucosidasa de almendras. Para ello se determinaron los parámetros cinéticos ( $V_{max}^{ap}$  y  $V_{max}^{ap}/K_m^{ap}$ ) en un intervalo de pH y temperatura de 4.8 - 6.0 y 21 - 41°C, respectivamente.

Se encuentra que el pH afecta tanto la entalpía de activación como el factor pre-exponencial, observándose una tendencia en la entalpía de activación a disminuir a ambos lados de la zona de pH óptimo. La entalpía de activación independiente del pH, obtenida a partir de  $V_{max}^{ap}/K_m^{ap}$ , es mayor que la obtenida en el pH óptimo, sin embargo se ve compensada por un mayor factor pre-exponencial. Es posible explicar estos resultados por la presencia de dos grupos disociables en la enzima que presentan una variación de entalpía estándar de ionización, negativa y positiva al lado ácido y básico del pH óptimo, respectivamente.

(Financiado por D.G.I., UCV).

**48 - UNA MIRADA A LA RELACION ENTRE OXIGENO, CELULAS Y ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS.** (Looking at oxygen, cells and biological structures) LEIGHTON, F. Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, P. Universidad Católica de Chile

El oxígeno es el tercer elemento en abundancia del universo y la vida aeróbica se define por su utilización energética como aceptor de electrones. El oxígeno es reactivo y en su estado basal se le considera un diradical. Hay compartimentalización en el metabolismo del  $O_2$ ; en forma general, la mitocondria produce  $CO_2$  al oxidar sustratos utilizando  $O_2$  y  $H_2O$  en la fosforilación oxidativa al reducirlo completamente; los peroxisomas lo reducen parcialmente a  $H_2O_2$ ; la membrana plasmática genera superóxido; en retículo endoplásmico se descompone en  $H_2O$  y ROH; y donde haya ácidos grasos poliinsaturados, espontánea o enzimáticamente reacciona con los protones doblemente alílicos generando especies reactivas. Otras reacciones acompañan a las citadas o existen *per se*, generándose así «especies reactivas de oxígeno» (EROs) muchas de las cuales son radicales libres. Adentro y fuera de las células, lípidos, proteínas, y otras moléculas, reaccionan con oxígeno y con EROs. La oxidación de lipoproteínas del plasma constituyen un modelo para este tipo de reacciones. La reactividad del oxígeno y de las EROs lleva a alteraciones bioquímicas asociadas a daño celular, arterioesclerosis, cáncer, envejecimiento y otras patologías. Este daño llevó al concepto de estrés oxidativo, definido como el daño que resulta al ser sobrepasadas las múltiples defensas antioxidantes, intra y extracelulares. Sin embargo, las EROs también pueden constituir señales regulatorias y recientemente se les ha involucrado directamente en la activación de numerosos factores de transcripción. Las múltiples interacciones aparentes entre diferentes EROs, y también entre los varios componentes de la respuesta antioxidante de células y organismos, constituyen un patrón bioquímico que en su conjunto nos ha llevado a considerar en nuestro laboratorio, que más que a componentes tóxicos, la célula reacciona a una variable fisiológica que denominamos «tono oxidativo», a cuya intensidad responde coordinadamente con variados mecanismos, regulando la expresión de algunos genes.

(Proyecto FONDECYT N° 666/94)

**49 - EL PROYECTO GENOMA HUMANO Y SU IMPACTO EN LA BIOMEDICINA** (The Human Genome Project and its impact on Biomedicine) **CARVALLO P.**, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El PROYECTO GENOMA HUMANO comenzó a fines de la década del 80, y ha tenido un desarrollo vertiginoso. Este proyecto consta de diferentes etapas, que comprenden la constitución de un mapa genético, físico, molecular, y fisiológico. Es decir desde el conocimiento de la localización relativa de regiones del DNA, hasta la secuencia, función y regulación de toda la información contenida en éste. Después de ocho años de comenzado este gran proyecto, se ha logrado tener a fines de 1994, el primer mapa genético del genoma completo. Además se tienen los mapas físicos de diversos cromosomas. En paralelo con el mapeo del genoma humano, se está realizando un estudio similar en *levadura*, *C.elegans*, *Drosophila*, *ave* y *ratón*, entre otros. Estos otros mapas están tremendamente avanzados, y el conocimiento derivado de éstos ayudará a comprender mejor el funcionamiento y regulación del genoma humano.

El impacto que ha tenido el Proyecto Genoma Humano en la Biomedicina, ha derivado del impresionante desarrollo de la tecnología relacionada con este campo, además del cumplimiento de la primera etapa del Proyecto, que fue el primer MAPA GENÉTICO. Si bien la Genética Molecular comenzó su desarrollo antes del Proyecto Genoma, su evolución ha sido aún mayor en los últimos años. El mapeo de genes responsables de enfermedades genéticas ha crecido en forma impresionante, gracias al hallazgo de nuevos marcadores polimórficos, y al conocimiento del primer mapa genético. Sin duda alguna el PROYECTO GENOMA HUMANO llevará a un desarrollo vertiginoso de la GENÉTICA MOLECULAR, permitiendo el conocimiento de la función y regulación de numerosos genes responsables de enfermedades genéticas invalidantes, o que causan muerte prematura en tantos seres humanos. Este conocimiento llevará también a desarrollo de la terapia génica, y su impacto final en la BIOMEDICINA.

**50 -AMPLIFICACION DEL FRAGMENTO CDR3 DEL GEN DE LA CADENA PESADA DE LA INMUNOGLOBULINA(IgH) EN LA DETECCION DE ENFERMEDAD RESIDUAL MINIMA (ERM) EN LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA(LLA).** **BARRIGA, F.**, RISUEÑO, C., SALGADO, C., BERESSI, V. BECKER, A., CAMPBELL, M., LEGÜES M. E., CABRERA M. E. Universidad Católica de Chile. Hospital Exequiel González Cortés, Hospital Luis Calvo Mackenna, Hospital Roberto del Río, Hospital Salvador.

Hemos realizado amplificación del fragmento CDR3 del gen IgH para detección de ERM en muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes con LLA de estirpe B en aparente remisión hematológica.

35 pacientes de los centros participantes han ingresado en el estudio, todos con LLA de estirpe B definido por inmunofenotipo (CD19+, CD7-) y que comenzaron tratamiento con protocolo nacional. El fragmento CDR3 del gen IgH de la muestra inicial fue amplificado con partidores de cada familia variable (VH, n=6) y para la región JH. Los productos amplificados fueron digeridos con HaeIII para obtener una sonda clon específica, y secuenciados. De la secuencia obtenida se identificaron y sintetizaron oligonucleótidos clon específicos. Muestras de médula ósea y sangre periférica en remisión al mes y a los 4,7,11,15,18 y 24 meses post diagnóstico fueron obtenidas amplificándose la región CDR3 con partidor para la región FR2 y el partidor JH, seguido de reamplificación "half nested" con un partidor para la región FR3. Los resultados de la reamplificación fueron hibridizados separadamente con las sondas y oligonucleótidos clon específicos mediante Southern blot.

Tanto los oligonucleótidos como las sondas clon específicas hibridizaron con DNA amplificado de la muestra original en cada caso y la señal fue detectada de forma variable en las muestras de seguimiento: 5/6 pacientes demostraron presencia de ERM en la muestra obtenida después del primer mes de tratamiento, en cuatro desapareció después del 4° mes y en uno hubo persistencia hasta el mes 18. En tres casos hubo detección diferencial de ERM entre muestras de médula ósea y sangre periférica concurrentes, siendo indistintamente positivas o negativas. La sensibilidad de la sonda clon específica comparada con el oligonucleótido fue de 95% y la especificidad de 61% en 46 muestras pareadas.

**Conclusión:** La amplificación de la región CDR3 del gen IgH permite obtener secuencias clon específicas útiles para la detección de ERM en LLA. El seguimiento a largo plazo de los pacientes permitirá definir su sensibilidad en la detección precoz de recaída.

Financiado por proyecto Fondecyt #1940635.

**51 - ESTUDIO GENETICO MOLECULAR DE LA FIBROSIS QUISTICA EN PACIENTES CHILENOS.** (Molecular Analysis of Cystic Fibrosis in Chilean patients). RIVEROS, N., RÍOS, J. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva y letal de alta incidencia en la población caucásica (1:2000 nacidos vivos). El gen alterado, codifica una proteína que participa en el transporte epitelial de Cl-(CFTR). Un 70% de los cromosomas de la población FQ mundial presentan una delección de 3 pb en la región codificante del gen (DF-508). El 30% restante presentan a los menos 100 mutaciones diferentes cuya frecuencia individual no supera un 3%. La frecuencia relativa de estas mutaciones así como la incidencia de la enfermedad varía entre diferentes poblaciones y grupos étnicos de Europa y América. Se ha descrito muy pocos casos de FQ en poblaciones de Asia y África.

La composición racial de la población chilena, con alta contribución de genes caucásicos, especialmente españoles, hace suponer que la incidencia de la FQ en el país debiera ser mayor que la observada. Esta baja incidencia podría atribuirse, entre otras causas, a factores genéticos o ambientales que determinarían una manifestación particular de la enfermedad en nuestro medio, dificultando su diagnóstico.

El análisis molecular realizado en 40 pacientes FQ chilenos muestra que la frecuencia de DF-508 en nuestra población es significativamente menor que en la población caucásica (29%). Las mutaciones R-553X y W-1282X están presentes en la muestra, no así la  $\Delta I507$ , G-542X, G-551D, N-1303K, 3905-insT y 171716>A, todas ellas descritas entre las más frecuentes en la población FQ mundial. El 65% de los cromosomas de pacientes chilenos FQ son portadores de mutaciones indeterminadas.

Mediante el uso de los marcadores genéticos METH y KM19 se ha iniciado el estudio de regiones polimórficas que segregan en desequilibrio de ligamiento con el gen CFTR. El análisis de haplotipos en cromosomas normales y mutados y la asociación de estos haplotipos con mutaciones específicas, descrita en la literatura, aportarán una valiosa información acerca del origen de la enfermedad en el país, sus características moleculares y su real dimensión.

**52 - VARIANTES DEL GEN P450c11AS (ALDOSTERONA SINTETASA) EN PACIENTES CON HIPERTENSION ARTERIAL (HTA) HIPORRENINEMICA.** (Variants of P450c11AS gene (aldosterone synthase) in patients with low renin hypertension). FARDELLA, C., MONTERO, J., ZHAN, G.G, RODRÍGUEZ, H, VIGNOLO, P., MILLER W. Dptos de Endocrinología y Medicina Interna de la Escuela de Medicina y Centro de Investigaciones Médicas de la P. Universidad Católica de Chile. Dpto. de Pediatría de la Universidad de San Francisco, California USA.

La HTA constituye una de las patologías más prevalentes (15% de la población mundial) y con mayor impacto en la salud de la población. Sin embargo, en más del 90% de los casos la HTA no tiene causa conocida y se le denomina esencial. Un subgrupo de HTA esencial lo constituye la HTA hiporreninémica (aprox. 20% del total) en la cual se han detectado niveles desproporcionadamente altos (en relación a renina) de aldosterona y otros mineralocorticoides. Un modelo animal de HTA hiporreninémica lo constituyen las ratas Dahl, en ellas se ha demostrado que la elevación de la presión arterial y la caída de los niveles de renina se debe a un aumento en la síntesis de mineralocorticoides. El estudio de estas ratas ha puesto en evidencia que mutaciones en el citocromo suprarrenal P450c11AS son la causa del aumento en la síntesis de estos mineralocorticoides y que estas mismas mutaciones recreadas artificialmente en el cDNA humano (especialmente Lisina 251 a Arginina) tienen igual efecto.

Con el fin de determinar si un mecanismo de este tipo opera en humanos con HTA hiporreninémica, estudiamos el gen que codifica para el P450c11AS de 14 sujetos con HTA (Presión >140/90 mmHg), renina suprimida (<0.5 ng/ml/hr) y aldosterona normal-elevada (rango: 3.2 a 28.4 ng/dl). En todos ellos se amplificó por PCR los 9 exones que componen el gen y sus productos fueron secuenciados directamente, comparándose los resultados con los previamente publicados y con los detectados en un grupo control (n=5). Los resultados de este estudio demostraron que en el exon 3 (codon 173) 6 hipertensos presentaban el cambio de Lisina a Arginina de los cuales 2 eran homocigotos y 4 eran heterocigotos a diferencia de los normotensos que solo tenían Lisina en dicha posición. Está por determinarse si este cambio tiene una relación causal con la aparición de hipertensión, es un marcador de ella o sólo un polimorfismo. Dado los resultados encontrados en ratas Dahl y en las mutaciones artificiales inducidas al P450c11AS humano, no es improbable que el cambio de Lisina 173 a Arginina puede afectar la síntesis de mineralocorticoides.

Proyecto Fondecyt 1951094 y Proyecto DIUC 94/03 E

**53 - URIDINA DIFOSFATASA (UDPasa) DE APARATO DE GOLGI DE TALLOS DE ARVEJA. ANALISIS DE LA EXPRESION Y PURIFICACION.** (Uridine Diphosphatase (UDPase) from Golgi Apparatus from Pea Stems. Expression Analysis and Purification.) **NORAMBUENA, L.** y **ORELLANA, A.** Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El aparato de Golgi en células vegetales aparece bastante desarrollado en los meristemas apicales. Una de las razones es la activa síntesis de elementos de pared celular, tales como hemicelulosas y pectinas, que se sintetizan en este organelo. La mayor expresión de este organelo implica mayor biogénesis de él. Esto implica una mayor expresión de los genes que codifican para proteínas que componen el aparato de Golgi. Por otra parte, se requiere que los elementos que componen el aparato de Golgi, en particular las proteínas, tengan la destinación o retención apropiada. ¿Como se regula la expresión de los genes para proteínas que componen el aparato de Golgi y cuáles son las señales involucradas en la correcta destinación? son preguntas que hasta el momento no tienen respuesta. Una de las razones es la falta de identificación a nivel molecular de componentes específicos del aparato de Golgi, que presentan regulación de la expresión, y la posterior obtención de sus genes. En este trabajo hemos analizado la expresión de Uridina Difosfatasa latente, una enzima de aparato de Golgi de células vegetales, realizando gradientes lineales de sacarosa de distintas zonas de los tallos de arveja. Nuestros resultados muestran que la enzima se expresa hacia el meristema apical de tallos de arveja. En vista que esta enzima es un buen candidato para realizar estudios de expresión génica y destinación, hemos comenzado la purificación de la enzima con el fin de llegar a obtener secuencia de aminoácidos que conduzcan posteriormente al clonamiento del gen. En esta presentación se mostrará la purificación de la enzima y la caracterización de ella.

Financiado por Fondecyt 1940571

**55 - MUTACIONES EN EL INTRON III DEL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE HORMONA DE CRECIMIENTO AUTOSOMICA DOMINANTE (5' splice site mutations in the growth hormone gene causing autosomal dominant growth hormone deficiency)** **MISSARELLI, C.<sup>1</sup>**, **MERICQ, V.<sup>2</sup>**, **JARA A.<sup>3</sup>** y **CARVALLO, P.<sup>1</sup>**. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, e Instituto Materno Infantil, Universidad de Chile, y Servicio de Endocrinología, Hospital Roberto del Río<sup>3</sup>.

La deficiencia aislada de hormona de crecimiento se ha clasificado en cuatro subtipos: IGHD 1A, 1B,2 y 3. La IGHD 2 es particularmente interesante ya que tiene una herencia de tipo autosómica dominante. Hemos estudiado dos familias chilenas en las cuales algunos de sus componentes sufren de una deficiencia de hGH, caracterizada clínicamente. Estos pacientes no elevan sus niveles de hGH al ser tratados con el factor liberador de hGH, u otros tratamientos equivalentes. En ambas familias sólo uno de los padres sufre esta deficiencia, por lo que se sospecha una herencia de tipo autosómico dominante, y una IGHD 2. El análisis de ligamiento génico realizado en una de las familias resultó informativo para uno de los polimorfismos estudiados, sugiriendo que la causa de la deficiencia en el padre y dos de sus hijos se encontraba en el gen de hGH. Se realizó la secuenciación de este gen en los cinco componentes de esta familia encontrándose una mutación puntual G-A en la primera base del intrón III. En la segunda familia en estudio se procedió a secuenciar directamente el gen de hGH del padre, la madre y la hija afectada, encontrándose una mutación puntual G-A en la quinta base del intrón III. En ambas familias la mutación está presente en forma heterocigota, y sólo en los individuos afectados. Ya que existe un 100% de conservación de la primera base (G) de los intrones de todos los genes de mamíferos, y una alta conservación de otras bases cercanas al exón, es altamente probable que estas mutaciones afecten drásticamente el "splicing" del pre-mRNA. Experimentos futuros pretenden determinar el motivo por el cual este tipo de mutaciones resulta en una herencia de tipo dominante.

(Financiado por FONDECYT 194-0546)

**56 - CARACTERIZACION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION Pit-1 en *C. carpio*.** (Characterization of transcription factor Pit-1 in *C. carpio*) **KAUSEL, G.**, **VERA, M.I.**, **FIGUEROA, J.**, **MOLINA, A.**, y **KRAUSKOPF, M.** Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Los mecanismos moleculares que configuran el ajuste adaptativo, de ectotermos euritermales, frente a cambios ambientales en el habitat, implican una respuesta articulada que involucra reprogramación de la expresión génica y una probable coordinación que comprometería la actividad del eje hipotálamo-hipofisario. Durante la aclimatización estacional, la carpa exhibe notables cambios que revelan una conmutación ordenada de eventos transcripcionales en diversos tejidos. En la búsqueda de moléculas que participen en la organización del proceso de ajuste, hemos determinado que prolactina, sintetizada en la rostral pars distalis de hipófisis de la carpa, se expresa preferentemente en verano (Figueroa et al., (1995) Comp. Biochem. Physiol., 108B, 551-560). Por otra parte hemos observado que la expresión de la hormona de crecimiento, que acontece en la proximal pars distalis, no exhibe cambios tan notorios entre carpas de verano e invierno. La expresión de prolactina, como la de hormona de crecimiento y somatolactina en teleosteos, parecen estar moduladas por un factor de transcripción, el factor Pit-1, miembro de la familia POU implicada en el control del desarrollo en mamíferos. En efecto, Pit-1 está presente en peces y podría ser determinante en la expresión de hormonas comprometidas en la articulación molecular de la respuesta compensatoria a cambios ambientales. Para estudiar Pit-1 de carpa se eligieron dos oligonucleótidos contenidos en una localización altamente conservada del dominio POU. Por amplificación por PCR se generó una sonda de 93 pb que en una hibridación en Northern blot, reconoció específicamente bandas de RNA proveniente de hipófisis de carpa de verano. Esta sonda se utilizó para rastrear una biblioteca genómica de carpa y otra, de cDNA de hipófisis de carpa. Actualmente se están secuenciando algunos recombinantes para identificar inequívocamente la naturaleza de éstos.

(Financiado por Grants FONDECYT 2950042, 1940845, e ICGEB GE/GLO/90/004)

**54 - QUITINASAS EN LA RESPUESTA DE *Citrus limon* A LA INOCULACION CON PATOGENOS** (Chitinases in the *Citrus limon* response to inoculation with pathogens) **FANTA, N.**, **PÉREZ, L. M.** Dep. Bioquímica y Biología Molecular., Fac. Ciencias. Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Las quitinasas (Qasas) de plantas son consideradas dentro de las proteínas relacionadas con patogénesis (PRP), ya que participan en el mecanismo de defensa frente a patógenos. Se desconoce si están presentes en *C. limon* y si participan en su defensa.

Se analizó la presencia de Qasas en plántulas de limonero sanas e inoculadas con *Alternaria alternata*, o inducidas con daño mecánico o luz UV, en presencia y ausencia de inhibidores de síntesis proteica. La actividad se visualizó a través de zimogramas después de separar las proteínas totales en geles nativos de poliacrilamida, ácidos y básicos. Las plántulas de *C. limon* sanas contienen isoenzimas de Qasas, y aquellas inoculadas con el hongo aumentan el número de las mismas. Estas Qasas se caracterizan por ser de carácter tanto ácido como básico. La aparición de nuevas quitinasas en respuesta a la inoculación fúngica, es inhibida por alfa-amanitina, no así por cicloheximida. Resultados similares se obtienen al producir daño mecánico e irradiar con luz UV. El conjunto de resultados sugiere que la presencia de Qasas en plántulas de limonero, está relacionada con su defensa frente a *A. alternata*.

Financiamiento FONDECYT 1940441 y 2950046.

**57 - REACCIONES DE OXIDACION CATALIZADAS POR LA Mn-PEROXIDASA DE *Ceriporiopsis subvermispota*.** (Oxidation reactions catalyzed by Mn-peroxidase from *C. subvermispota*). LARRONDO, L., URZÚA, U., LOBOS, S., LARRAÍN, J. y VICUÑA R. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El basidiomicete de pudrición blanca *Ceriporiopsis subvermispota* posee un sistema ligninolítico constituido por Mn-peroxidasa (MnP) y lacasa. La MnP se expresa como un conjunto de isoenzimas extracelulares que muestran diferentes puntos isoeléctricos de acuerdo al medio en el cual es cultivado el hongo. A partir de cultivos líquidos de composición definida y de cultivos en fase sólida, se purificaron 11 isoenzimas de MnP. Contrario a lo descrito en la literatura, en la cual se ha caracterizado a esta enzima como una peroxidasa que muestra un requerimiento estricto de Mn(II), se observó que las isoenzimas de MnP de *C. subvermispota* presentan una dependencia parcial de Mn(II) en la oxidación de sustratos como *o*-dianisidina, *p*-anisidina, vanillilcetona y ABTS, mientras que para oxidar guaiacol el requerimiento de Mn(II) es casi absoluto. Además, tanto en presencia como en ausencia de Mn(II), la oxidación de *o*-dianisidina es estimulada por ácido oxálico, un compuesto derivado del metabolismo de carbohidratos, que también es secretado al medio extracelular por el hongo.

La actividad de MnP *in vivo* requiere la existencia de un sistema productor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En otros hongos se han descrito oxidasas extracelulares que cumplirían esta función, pero en *C. subvermispota* no ha sido posible detectar esta actividad. En relación a esto, se observó que la MnP es capaz de oxidar ácido kójico en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una reacción que depende de Mn(II) y que es inhibida por catalasa. Esta observación sugiere que la MnP tiene la capacidad de actuar como oxidasa frente a ciertos compuestos, lo que le permitiría generar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requerido para oxidar la lignina.

**58 - POSIBLE HISTONA QUIMERICA EN LA CROMATINA DE TRYPANOSOMA CRUZI.** (A chimeric histone in *Trypanosoma cruzi* chromatin?) GALANTI, N.; TORO, G.C.; WERNSTEDT, C. y HELLMAN, U. Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden.

Las histonas son proteínas pequeñas, muy básicas, carentes de triptofano y muy conservadas durante la evolución biológica. Constituyen el núcleo central en la organización, compactación y función de la cromatina en eucariontes. Durante la caracterización sistemática de las histonas de *T. cruzi*, hemos descrito una proteína cromosomal (banda b) que presenta características de histonas del núcleo nucleosomal, pero con un importante grado de polaridad. En este trabajo se presenta la secuencia de aminoácidos de péptidos derivados de esta proteína.

Histonas de *T. cruzi* se fraccionan por electroforesis en geles conteniendo Tritón, urea y ácido acético. La banda b, proveniente de varios geles, fue cortada y digerida con tripsina; los péptidos resultantes se fraccionaron por HPLC en fase reversa y diez de ellos se analizaron en un secuenciador de aminoácidos.

Cuatro péptidos, uno de 26 aminoácidos, presentan identidad con la región globular de la histona H3. Otros dos péptidos mostraron homología con una proteína encontrada en suero de enfermos chagásicos. Finalmente, otros cuatro péptidos no alinearon con proteína alguna. Uno de los péptidos, de 9 aminoácidos, presenta 7 residuos con homología a histona H3 y otros dos (WX) no homólogos. El aminoácido X presenta características de ácido gamma-carboxiglútamico.

Se propone que la banda b es una proteína cromosomal quimérica formada por la región globular de la histona H3 y una proteína cromosomal antigénica.

Financiado por SAREC y FONDECYT-1940314.

**59 - EFECTO DE FIBRATOS EN LA INDUCCION DE LA EXPRESION DEL GEN MDR2 Y LA SECRECION BILIAR DE FOSFOLIPIDOS EN EL RATON.** (Fibrates induce *mdr2* gene expression and biliary phospholipids secretion in the mouse). WIELANDT, A.M., VOLLRATH, V., AMIGO, L., RIGOTTI, A., \*GONZALEZ, S., \*ANDRADE, L., PIZARRO, M., NERVI, F., ACCATINO, L., y CHIANALE, J. Departamentos de Gastroenterología y \*Anatomía Patológica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La disrupción del gen *mdr2* produce la ausencia completa de la secreción de fosfolípidos biliares. La deficiencia de fosfolípidos biliares tiene un rol en desórdenes hepatobiliares caracterizados por la destrucción colangítica. El desarrollo de modelos farmacológicos o dietéticos que modulen el gen humano *MDR2* estimulando la secreción biliar de fosfolípidos tendrían implicaciones terapéuticas importantes en algunas enfermedades colestásicas del hígado. Formulamos la hipótesis que el aumento de la excreción de fosfolípidos biliares inducido por algunos agentes hipolipemiantes como fibratos es mediado por la inducción del gen *mdr2* y su producto codificado la glicoproteína P. Se observaron niveles aumentados de los mRNA del gen *mdr2* en los hígados de los animales tratados con diferentes fibratos: ciprofibrato: 660±155% (comparado con el grupo control), clofibrato: 611±77%, bezafibrato: 410±47%, fenofibrato 310±52%, gemfibrozilo: 190±25% (p<0.05). La inducción de la expresión de la familia de genes *mdr* fue específica para el gen *mdr2*. Se observó un incremento de 2 a 3 veces de la inmunodetección de la P-gp en el dominio de la membrana plasmática canalicular en los animales tratados con clofibrato y ciprofibrato. La excreción biliar de fosfolípidos aumentó significativamente de 4.2±1.2 nmol/g/min en el grupo control a 8.5±0.6 en los animales tratados con ciprofibrato, 7.1±2.9 en clofibrato y 5.8±2.8 en bezafibrato. (p<0.05). Se observó una significativa correlación entre la excreción biliar de fosfolípidos y los niveles relativos de *mdr2* mRNA (r=0.86; p<0.05). El flujo biliar, la secreción de colesterol y la excreción de sales biliares no se modificaron en los animales tratados. Estos resultados demuestran que algunos fibratos inducen selectivamente la expresión del gen *mdr2*, su producto de codificación la P-gp y concomitantemente aumentan la excreción de fosfolípidos biliares en el ratón. Este estudio es concordante con la hipótesis que la P-gp, codificada por el gen *mdr2*, está involucrada en la secreción biliar de fosfolípidos, actuando como un transportador de fosfolípidos o flipasa en la membrana canalicular del hepatocito.

**60 - SÍNTESIS DE HISTONAS EN *Trypanosoma cruzi*.** (Histone synthesis in *Trypanosoma cruzi*). SABAJ V. \* y GALANTI N. Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las histonas de metazoos constituyen un ejemplo de proteínas cuya síntesis ocurre acoplada a la replicación del DNA. No obstante, además de variantes replicativas se ha descrito variantes de reemplazo de estas proteínas cromosomales.

En *T. cruzi*, protozoo parásito que no condensa su cromatina en cromosomas durante la división celular, se ha descrito histonas cuyas secuencias de aminoácidos difieren de sus homólogas de eucariontes superiores. En protozoos, la síntesis de histonas ha sido pobremente caracterizada. En este trabajo se describe la síntesis de estas proteínas cromosomales en *T. cruzi*. Formas epimastigotes de *T. cruzi* en fase logarítmica o estacionaria de crecimiento, o cuya replicación del DNA se sincronizó con hidroxiaurea, se incubaron en presencia de lisina-H<sup>3</sup> o arginina-H<sup>3</sup>. Se obtuvo cromatina, se extrajeron las histonas y se determinó la incorporación de estos aminoácidos en dichas proteínas cromosomales. Adicionalmente, las histonas se separaron por electroforesis y se analizaron por autoradiografía.

Se estableció la existencia de dos poblaciones de histonas. La síntesis de una fracción de histona H1 es independiente de la replicación del DNA; la síntesis de otra fracción de H1 y la totalidad de las histonas del núcleo nucleosomal está acoplada a la replicación del DNA. En tripomastigotes, formas celulares en reposo proliferativo, está ausente la fracción de histona H1 cuya síntesis no está acoplada a la replicación del DNA.

Se concluye que la forma proliferativa de este protozoo se comporta como eucariontes superiores, en cuanto a la síntesis de histonas. La ausencia de síntesis de histona H1 en la forma no proliferativa podría deberse a la falta de expresión de los genes que codifican para esta proteína, probablemente debido al fuerte grado de compactación de la cromatina en esta forma celular.

Financiado por SAREC y FONDECYT-Chile. - # Becada Conicyt.

**61 - FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATO INHIBE LA SÍNTESIS DE GLICÓGENO EN OOCITOS DE RANA** (Fructose-2,6-bisphosphate inhibits glycogen synthesis in frog oocytes). **KESSI\*, E.**, GUIXÉ<sup>1</sup>, V. PRELLER<sup>1</sup>, A. y URETA<sup>2</sup> T.\*Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, <sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

En oocitos de rana, el destino principal de la glucosa microinyectada es la síntesis de glicógeno. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que la síntesis de glicógeno en oocitos ocurre, al menos parcialmente, por una vía indirecta que implica la metabolización de glucosa hasta lactato y posterior reconversión de éste en residuos glucosilo de glicógeno usando reacciones de la vía gluconeogénica. En el presente trabajo, se muestra que la microinyección de fructosa-2,6-bisP inhibe la incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa en glicógeno y resulta en acumulación de lactato. El valor de I<sub>50</sub> es 2 μM, similar al obtenido *in vitro* para la inhibición de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de oocitos. El uso de varios análogos de fru-2,6-bisP demuestra que el efecto sobre la síntesis de glicógeno es específico y se correlaciona con su efecto sobre la actividad de la enzima. La medición de los niveles de fru-2,6-bisP muestra que los oocitos no perturbados poseen una concentración intracelular del efector de 0,56 μM. Fru-2,6-bisP microinyectado, en presencia o ausencia de glucosa, es degradado en la célula. Los resultados indican que en oocitos de rana la síntesis de glicógeno utiliza reacciones de la vía gluconeogénica y que su inhibición por fru-2,6-bisP resulta de la inhibición de la reacción catalizada por la FBPa. Además, la presencia en oocitos de fru-2,6-bisP y su degradación intracelular, sugiere que estas células poseen el sistema enzimático responsable de la síntesis y degradación del efector. (Proyecto Fondecyt 1940583).

**62 - UNIÓN COVALENTE DEL RADICAL α-HIDROXIETILO A PROTEÍNAS: ¿UN NUEVO MARCADOR DE CONSUMO DE ALCOHOL?** **MONCADA, C.<sup>1</sup>**, VARGHESE, G.<sup>2</sup> e ISRAEL, Y.<sup>3</sup> <sup>1</sup>Departamento de Ciencias Farmacológicas y Toxicológicas, Universidad de Chile. <sup>2</sup>Department of Pharmacology, University of Toronto. <sup>3</sup>Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Jefferson Medical College. Trabajo de incorporación auspiciado por: A. Morello

El etanol expresa sus acciones tóxicas en prácticamente todos los tejidos, incluyendo hígado, páncreas, cerebro y corazón. Sin embargo, la existencia de un mecanismo único para dar cuenta de esta amplia gama de efectos tóxicos ha intrigado a los científicos por décadas. El radical libre α-hidroxi-etilo, un metabolito de la oxidación del etanol, se ha encontrado en variados sistemas biológicos en presencia de etanol, tanto *in vitro* como *in vivo*. En trabajos recientes se ha demostrado <sup>14</sup>C-etanol se incorpora covalentemente a componentes microsomales en presencia de NADPH y oxígeno. Bajo estas condiciones se genera acetaldehído y radicales α-hidroxi-etilo, sin embargo, la adición del atrapador de radicales libres 4-(piridil-1-oxido)-t-butyl nitrona (POBN) redujo la incorporación de <sup>14</sup>C presumiblemente por secuestro del radical α-hidroxi-etilo, ya que la producción de acetaldehído no se vio afectada en presencia o ausencia de POBN. Por otra parte nuestro grupo ha demostrado recientemente que los productos de la incubación de microsomas con etanol, NADPH y oxígeno, son inmunogénicos. Mostramos además que cuando se trataron ratas con etanol crónicamente, éstas generaron anticuerpos que reconocen los productos formados entre el radical α-hidroxi-etilo y albumina sérica. Sin embargo, la unión covalente del radical α-hidroxi-etilo a proteínas no había sido demostrada.

Los estudios que presentamos aquí muestran que el radical α-hidroxi-etilo, generado *in vitro* a partir de <sup>14</sup>C-etanol y un sistema Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup>), reacciona con albumina sérica para formar aductos covalentes. La albumina sérica, utilizada como proteína modelo en nuestros experimentos, compete en forma efectiva con el atrapador de radicales libres 4-(piridil-1-oxido)-t-butyl nitrona por el radical α-hidroxi-etilo. Nuestros estudios de resonancia paramagnética de electrón muestran que el radical α-hidroxi-etilo, también puede ser formado cuando el etanol es incubado simplemente en un tampón de fosfato que contiene hierro en cantidades trazas, es decir, en ausencia de la reacción de Fenton. Bajo estas condiciones una molécula de albumina se une a un radical α-hidroxi-etilo. La capacidad del radical α-hidroxi-etilo de unirse covalentemente a proteínas podría tener importancia en el diseño de nuevos métodos para la identificación de abuso crónico a etanol.

**63 - METODO PARA MEDIR TASAS DE CICLO FÚTIL EN CONDICIONES DE METABOLISMO GLICOLÍTICO Y GLUCONEOGÉNICO** (A method to assess rates of futile cycles during glycolytic and gluconeogenic metabolism) **GUIXÉ, V., TORRES, J.C.** y **BABUL, J.** Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La operación simultánea de las reacciones catalizadas por la fosfofructoquinasa (Pfk) y fructosabisfosfatasa (Fbpa) a la misma velocidad, resulta en el consumo de ATP sin transformación neta del sustrato, lo que se denomina ciclo fútil.

Para medir las tasas de este ciclo se presenta un método nuevo, el que se ilustra con un ensayo *in vitro* que utiliza reacciones que consumen o producen NADH, acopladas a las del ciclo. Tasas diferentes de ciclo fútil de tipo gluconeogénico se simulan agregando cantidades variables de Pfk y manteniendo fija la de Fbpa. La tasa de ciclo se calcula de la curva de progreso de la concentración de NADH producido o consumido por las reacciones acopladas a las del ciclo. En este ensayo el flujo de carbonos es desde fructosa-1,6-bisP (FBP) a 6-P-gluconato. Si se proporciona al sistema [<sup>14</sup>C]glucosa-6-P, la velocidad y magnitud de marcación de FBP es función de la actividad de Pfk, es decir de la tasa de ciclo. En el ensayo glicolítico, el flujo de carbonos es desde fructosa-6-P a glicerol-3-P. Al agregar [<sup>14</sup>C]fructosa-1,6-bisP, la velocidad y magnitud de marcación de fructosa-6-P es función de la actividad de la Fbpa, es decir de la tasa de ciclo.

La separación de los compuestos radiactivos se realizó por HPLC en una columna de intercambio iónico y se determinó la radiactividad asociada a FBP y a fructosa-6-P.

En ambos sistemas se encontró una relación hiperbólica entre la cantidad de enzima que se variaba y la tasa de ciclo, y una relación lineal entre la tasa de ciclo y la radiactividad del azúcar-P correspondiente.

(Financiado Proyectos Fondecyt 92/1136 y 1950297).

**64 - HOMOLOGÍA FUNCIONAL ENTRE LA PROTEÍNA PxA1 DE *Saccharomyces cerevisiae* Y LA PROTEÍNA DE LA ADRENOLEUCODISTROFIA HUMANA.** (Functional homology between the *Saccharomyces cerevisiae* Pxa1 protein and the human adrenoleukodystrophy protein.) **SAPAG, A.** & **VALLE, D.** Department of Pediatrics, School of Medicine, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA. Patrocinante: J. Eyzaguirre.

La adrenoleucodistrofia humana (ALD) es una enfermedad neurodegenerativa en la cual el metabolismo de ácidos grasos de cadena muy larga está defectuoso. En pacientes con ALD se han descrito mutaciones en ALDp, una proteína de la membrana peroxisomal cuya secuencia indica que es un transportador de tipo ABC. El ligando y la función de esta proteína se desconocen. En *S. cerevisiae* la proteína análoga a ALDp es Pxa1 (peroxisomal ABC transporter 1). En este trabajo se estudió si se puede asignar importancia funcional a dos regiones de Pxa1. La primera se asemeja a proteínas que tienen ligandos lipofílicos y la segunda es un bloque de 14 residuos semejante a la caja EAA de transportadores procarionóticos. Se generaron sustituciones de aminoácidos en Pxa1 y se evaluó la funcionalidad de las proteínas mutantes por complementación de un "knockout" de levadura que es incapaz de utilizar ácido oleico como única fuente de carbono.

En la región de posible unión de ácidos grasos la sustitución R108L abolió la capacidad de Pxa1 de complementar al "knockout" mientras que con R108K hubo complementación parcial; R→C se ha descrito en pacientes de ALD. En el bloque tipo EAA la sustitución E294D abolió la capacidad de complementación; E→D y E→Δ se han descrito en pacientes de ALD. La sustitución G301P también abolió la capacidad de complementación y G301A permitió complementación parcial. Este trabajo asigna importancia funcional a dos regiones de Pxa1 y establece homología funcional entre las proteínas Pxa1 de levadura y ALDp humana puesto que mutaciones en dichas regiones provocan disfunción en ambos sistemas.

Financiado por NIH (USA).



**65 - ACIDO NORDIHIROGUAYARETICO (NDGA) COMO RESTAURADOR DE LA SENSIBILIDAD A DROGAS EN EL CARCINOMA TA3 DE RATON SELECCIONADA POR RESISTENCIA A METOTREXATO (MTX).** (Nordihydroguaiaretic acid as sensitivity restorer to drugs in TA3 mouse carcinoma selected for resistance to methotrexate). FERREIRA, J., PAVANI, M., PEZO, J., BERROCAL, L., CORDANO, G., MUÑOZ, S. y GUERRERO, A. Departamentos de Bioquímica y Química y Medicina Experimental, Facultad de Medicina y Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El NDGA es un aditivo de alimentos que fue usado ampliamente. Si bien, es mejor conocido como inhibidor de las lipooxigenasas, también es atrapador de radicales libres, anticarcinogénico y antitumorigénico.

En estudios de crecimiento celular en cultivo, hemos observado que la sublínea TA3-MTX-R es resistente, además de MTX, a otras drogas que no comparten blancos citotóxicos comunes ni están relacionadas estructuralmente, como ser: doxorubicina (DOX) y cisplatino (CPT); por consiguiente, esta sublínea celular presenta multiresistencia. En cambio, NDGA inhibió fuertemente el crecimiento celular, el cual fue proporcional a la concentración y al tiempo de exposición al compuesto. Además, este tumor fue nuevamente vulnerable a MTX, DOX y CPT cuando fueron usados en combinación con NDGA.

NDGA también aumentó la incorporación de DOX y rodamina (RHO) e inhibió la salida de RHO (dependiente de la actividad de la Glicoproteína-P). Por otro lado, NDGA inhibió la respiración celular al bloquear el flujo de electrones a nivel del Complejo I; pero, tanto la utilización de glucosa como la producción de lactato no aumentaron significativamente. En consecuencia, los niveles de ATP intracelular disminuyeron por acción del NDGA, principalmente sobre el sistema de fosforilación oxidativa. Estos hechos explicarían tanto la inhibición del crecimiento celular como la inhibición de la actividad de la Glicoproteína-P y la consiguiente reversión de la multiresistencia que presenta esta sublínea tumoral.

Financiado FONDECYT, Proyecto N° 1931107

**66 - AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE GENES INDUCIBLES POR FRÍO EN ESPECIES DEL GÉNERO *Solanum*.** (Isolation and characterization of cold inducible genes in species of *Solanum* genus). MEZA-ZEPEDA, L.\*, BAUDO, M.\*\*, HEINO, P.\*\*, PALVA, T.\*\* y MEZA-BASSO, L.\*. (\*) Programa Biología Vegetal, Universidad de Talca, casilla 747, Talca; (\*\*) Department of Molecular Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia.

La especie *Solanum commersonii* posee la capacidad de aclimatarse al frío y ser resistente a heladas. En contraste, la papa doméstica *Solanum tuberosum* es incapaz de aclimatarse, siendo sensible a las temperaturas congelantes. A fin de comprender la variabilidad genotípica implicada en la aclimatación, se estudió el efecto frío en la especie *S. commersonii* en comparación con variedades domésticas y nativas de la especie *S. tuberosum*.

Se analizaron las secuencias aminoacídicas deducidas de genes inducibles pertenecientes a las familias DHN/LEA/RAB. Este análisis permitió el diseño de «primers» degenerados correspondientes a motivos conservados repetitivos de estos genes. Se amplificaron segmentos de DNA específicos de las especies en estudio, mediante la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

Un gen inducible por frío y ácido abscísico (ABA) exógeno fue amplificado desde el DNA genómico de *S. commersonii*. Un homólogo fue también identificado en diferentes variedades de la especie *S. tuberosum*. Se demostró que el frío y el ABA inducen la acumulación de un transcripto de 1 kpb. La inducción de estos genes ocurre tempranamente, siendo la expresión de los mismos regulada por la luz.

Se postula que para estos genes existirían dos vías de inducción independientes en ambas especies de este género.

Financiado: Proyecto Conicyt/Sarec; DIAT, Universidad de Talca.

**67 - UNION DE PEROXIDASA A MEMBRANAS DE RIBETE EN CEPILLO DEL INTESTINO DE *C. carpio*.** (Peroxidase binding to brush border membrane of *C. carpio* intestine). TOBAR, L., GOICOECHEA, O. y AMTHAUER, R. Instituto de Bioquímica, Instituto de Embriología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Se ha postulado que existirían sitios de unión específicos en la membrana de ribete en cepillo (BBM) en el intestino de peces, los que mediarían la absorción y transporte de proteínas intactas a través del epitelio intestinal.

Para desarrollar un ensayo de unión in vitro hemos aislado BBM y membranas basolaterales (BLM) del intestino de la carpa por centrifugación diferencial y precipitación con  $Mg^{2+}$ . Luego de incubar BBM con peroxidasa, las membranas se recuperan por centrifugación a través de un colchón de sacarosa. En las BBM recuperadas se cuantifica la cantidad de peroxidasa unida midiendo su actividad enzimática. Bajo condiciones de ensayo estándar se une 18 veces más peroxidasa a BBM que a BLM, lo que demuestra que la unión es selectiva. Cuando se agrega un exceso de peroxidasa inactivada al ensayo, se logra desplazar la unión a BBM en alrededor de un 80%. La unión específica de peroxidasa a BBM muestra una curva de saturación alcanzando un máximo a una concentración de 50 nM y con un Kd 23 nM. A medida que se disminuye la concentración de NaCl en el ensayo, la unión específica aumenta, lográndose un máximo de unión en ausencia de NaCl. La unión es dependiente del pH, alcanzándose un máximo a pH 7,5. Utilizando distintas proteínas como posibles competidores de la unión de peroxidasa a BBM, se encontró que albúmina de bovino, insulina, y HYDL de carpa no afectan la unión. En cambio ovoalbúmina, ferritina e IgG compiten parcialmente. Al utilizar poliones como polilisina y heparina se logra inhibir la unión de peroxidasa a BBM en un ~ 80%.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que existirían sitios de unión específicos de alta afinidad para peroxidasa en las BBL del epitelio intestinal del pez *C. carpio*.

Financiado por proyecto FONDECYT 1940847. DID-UACH S-95-23.

**68 - TRANSPORTE DE UDP-GLUCOSA EN VESICULAS DE GOLGI OBTENIDAS DESDE TALLOS DE ARVEJAS.** (UDP-Glucose Transport in Golgi Vesicles from Pea Stems). MUÑOZ, P. y ORELLANA, A. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El aparato de Golgi en células vegetales es el organelo donde se realiza la biosíntesis de hemicelulosas y pectina, componentes de la pared celular primaria. Se ha descrito, que en células en crecimiento alrededor del 80% del funcionamiento de este organelo estaría dedicada a la biosíntesis de estos polisacáridos. Los sustratos para la síntesis de los polisacáridos son nucleótidos azúcar. Anteriormente, hemos descrito que la glucosiltransferasa que utiliza UDP-glucosa se localiza en el lumen de las vesículas de Golgi. Este hecho plantea el problema de acceso del sustrato al lumen del organelo. En este trabajo describimos la presencia de una actividad de transporte de UDP-glucosa, presente en la membrana de las vesículas, que es necesaria para la síntesis de polisacáridos. Este transportador correspondería a una proteína de membrana. Se mostraron experimentos que indican que UDP-glucosa ingresa intacta a las vesículas, corroborando que sería un transportador de UDP-glucosa. Una vez en el lumen, glucosa es rápidamente transferida a polisacáridos, liberando UDP. Las vesículas de Golgi poseen una actividad de UDPasa latente, que puede posteriormente hidrolizar UDP a UMP. Experimentos realizados utilizando sustrato doblemente marcado ([ $^3H$ ] UDP-[ $^{14}C$ ] glucosa) sugieren que el recambio de los nucleótidos hacia el exterior de la vesícula es bastante rápido, y que por lo tanto UDP o UMP saldrían de la vesícula. Esta salida está acoplada a la entrada de nucleótidos azúcar siendo específica para nucleótidos y nucleótidos azúcar conteniendo uridina. Este resultado indica que el transportador de UDP-glucosa funcionaría como un antiporter.

Financiamiento: Fondecyt 1940571

**69 - ESTIMULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO EN GLÁNDULAS GÁSTRICAS AISLADAS** (Stimulation of nitric oxide synthesis in isolated gastric glands) <sup>1</sup>FUENTES, O., <sup>2</sup>MANN, G.E., <sup>2</sup>Sobrevia, L. <sup>1</sup>Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad del Bío-Bío, Chillán; <sup>2</sup>Vascular Biology Research Centre, King's College London, U.K.

Oxido nítrico (NO) activa el flujo sanguíneo, la secreción gástrica, y mantiene la integridad mucosal (Whittle y López-Belmonte, J. *Physiol. Pharmacol.* 44:91, 1993). Recientemente demostramos un aumento del transporte de L-arginina ( $\gamma^+$ /MCAT1), precursor del NO, en glándulas gástricas (GG) aisladas de conejo diabético (Sobrevia y Fuentes, J. *Physiol.* 482:24P, 1995). Este estudio evalúa la síntesis de NO en GG de conejos normales (N) y diabéticos (D). GG de conejos N y D (aloxano 90mg/kg) fueron preincubadas (15min) en 0.5M isobutilmetixantina y la acumulación celular de cGMP, índice de síntesis de NO, fue determinada en presencia de histamina (H, 100 $\mu$ M), bradiquinina (BK, 1 $\mu$ M), péptido intestinal vasoactivo (VIP, 1 $\mu$ M), insulina (0.1-100nM), L-arginina (0.01-10mM) o nitroprusiato de Na<sup>+</sup> (SNP, 100 $\mu$ M). Síntesis de NO fue medida en presencia y en ausencia del N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (100 $\mu$ M). Se observó que GG sintetizan NO *in vitro* y que la síntesis es estimulada por L-arginina sólo en animales N. H, BK y VIP estimulan la síntesis de NO en animales N y D. Insulina aumentó la síntesis de NO en conejos N, y disminuyó la síntesis aumentada de NO observada en conejos D. Lo anterior complementa el aumento de la actividad del sistema  $\gamma^+$  y la síntesis de NO observado en endotelio humano de gestaciones diabéticas (Sobrevia et al., J. *Physiol.* en prensa) y las alteraciones en sistemas de transporte de aminoácidos neutros en GG diabéticas (Fuentes et al. J. *Physiol.* en prensa).

FONDECYT (1940781), The British Council, Wellcome Trust (U.K.).

**70 - EFECTO DE ANALOGOS DE ACIL-CARNITINAS, INHIBIDORES DE PROTEINA QUINASA C *IN VITRO*, EN DESARROLLO TUMORAL *IN VIVO***. (Effect of acyl-carnitine analogs, *in vitro* protein kinase c inhibitors, on tumor growth *in vivo*) ROJAS, S., CÁRDENAS, L., VARGAS, L., y BRONFMAN, M. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La proteína quinasa C (pqc) es una enzima que fosforila residuos serina y treonina, aunque no tirosina, en proteínas endógenas. Es activada reversiblemente por fosfolípidos, particularmente fosfatidilserina y por calcio, así como también por diacilglicerol (DAG). Se ha demostrado que la pqc es el receptor principal de los ésteres de forbol, potentes promotores de tumorigénesis, que reemplazan al activador fisiológico, DAG. Estos antecedentes han llevado a muchos autores a buscar inhibidores específicos de la enzima, tanto para estudiar su rol fisiológico, como para determinar su uso potencial en terapia del cáncer. Se han descrito una gran variedad de compuestos capaces de inhibir a pqc. Sin embargo, todos ellos en mayor o menor grado inhiben también otras quinasa, o son muy tóxicos para la célula. La inhibición de la pqc por acil-Carnitinas *in vitro* ha sido descrita para palmitoil-carnitina. Desde el punto de vista de su utilidad en estudios *in vivo*, tiene el inconveniente de ser rápidamente metabolizada. Por esta razón, en nuestro laboratorio se han sintetizado análogos más estables de este compuesto (POC-car), los cuales resultaron ser buenos inhibidores de la quinasa. Resultados previos muestran que existe una correlación entre el grado de inhibición del crecimiento de células en cultivo y la concentración de POC-car, confirmando además el mayor efecto inhibitorio a medida que aumenta el largo de la cadena hidrocarbonada del análogo. En este trabajo se presentaron resultados preliminares de un estudio del efecto de POC-car en el desarrollo de tumores en el animal entero. Se utilizaron ratones hembra B-10 y la línea tumoral ensayada correspondió a un condrosarcoma humano. POC-car se administró en dosis de 100 mg/Kg animal entre los días 15 y 20 posinducción tumoral, en forma de una inyección diaria intratumoral. El tratamiento se inició con un diámetro tumoral de 10 mm. Como controles se utilizaron suero fisiológico y palmitoil carnitina. El tratamiento fue suspendido en el día 20 posinducción tumoral y los animales sacrificados el día 28. Los resultados fueron evaluados a través de la medición y comparación de los diámetros tumorales máximo y mínimo alcanzados en tratados vs controles al momento del sacrificio del animal. La efectividad del tratamiento se objetivó a través del T/C% (volumen tumoral tratado/ volumen tumoral control x 100). El grupo tratado logró un T/C% del 59%. En relación a efectos locales, no se apreciaron alteraciones salvo la caída de pelo en relación al sitio de inyección de la droga, sin gran emaciación, sin diarrea, sin muerte súbita intratratamiento. Los resultados muestran que POC-car logra una disminución efectiva del crecimiento tumoral en ratas tratadas versus controles.

(Financiado por Fondecyt 685-94).

**71 - EFFECT OF VESICLES ON CHEMICAL AND BIOLOGICAL REACTIVITY.** HERNÁN CHAIMOVICH, Instituto de Química Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil.

A number of amphiphiles, including some natural lipids, aggregate spontaneously in excess water to form a variety of supramolecular structures. These aggregates furnish a particular biomimetic system where the relationship of the monomer structure and the architecture of the structure can be investigated. Amphiphilic aggregates are also used to determine relevant features of chemical reactions occurring in dimensionally restricted environments. Some of these aggregates have found a wide variety of applications ranging from drug delivery to oil extraction. We have been particularly interested in determining interfacial effects on chemical and biological reactivity using vesicles as a model system. Vesicles accelerate ester thiolysis by several million fold. Analysis of this remarkable rate enhancement requires the dissection of the several components responsible for the observed effect as well as the detailed investigation of vesicular reaction sites. Here we will discuss reactions at several vesicular locations and describe reaction rate control. Methods of vesicle preparation and characterization will be presented. Poisson-Boltzmann analysis of ion distribution in both permeable and impermeable vesicle systems will be described. Predictions of ion distribution arising from the theoretical analysis in vesicles will be substantiated experimentally in the determination of free ion concentration at the vesicle interior. The comparison of the impermeable and permeable models raises relevant questions concerning the necessity of electrogenic pumps to create potential switches in small vesicles. Finally a proton-conducting protein from plan mitochondria will be presented.

**72 - ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEINA SRY DETERMINANTE DEL SEXO MASCULINO EN HUMANOS** (Monoclonal Antibodies to the Human Sex Determining Protein SRY). L. SALAS, M. ROSEMBLATT, K. MCELREAVEY\* y M. FELLOUS\*. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Universidad de Chile. \*Laboratoire de Immunogenetique Humaine. Institut Pasteur. Francia.

La determinación del sexo masculino en humanos está controlada por el gen SRY ubicado en el brazo corto del cromosoma Y. La proteína SRY codificada por este gen posee un sitio HMG de unión a DNA altamente conservado en varias especies de mamíferos, llevando a postular que SRY actuaría como un factor transcripcional. Con el fin de estudiar las posibles interacciones SRY- DNA o de SRY con otras proteínas nucleares es necesario contar con un sistema *in vitro* de expresión de SRY y con anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos para SRY.

El objetivo de este trabajo fue preparar mAbs anti-SRY y determinar la expresión de SRY en cortes de testículo humano y en la línea celular humana DU 145 (carcinoma prostático). Para la preparación de los mAbs, se inmunizaron ratones Balb/c con la proteína SRY recombinante purificada. Se obtuvieron 4 clones positivos detectados por ELISA. Estos clones se ensayaron mediante citometría de flujo sobre células en suspensión y por microscopía confocal en células adheridas o en cortes de testículo humano. Los resultados revelan que el clon LSR5.1 marca intracelularmente las células DU 145 y en menor proporción células Hela-7A. En cortes de testículo se detecta una marcación intracelular específica en células de Sertoli. Esto nos lleva a concluir que es posible determinar la presencia intracelular de SRY mediante reactivos inmunológicos como un primer paso en los estudios de las interacciones moleculares de SRY y tal vez para determinar posibles tipos de patologías sexuales relacionadas con esta proteína.

(Financiamiento: FONDECYT/INSERM, DTI B3271/9323 y FONDECYT 192-1062)

**73 - RESPUESTA GLOBAL DEL ARQUEON *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 FRENTE A LA HAMBRUNA DE FOSFATO.** (Global phosphate starvation response of the archaeon *S. acidocaldarius* BC65). OSORIO, G. y JEREZ, C. A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70086, Santiago-7, Chile

Las bacterias (dominio *Bacteria*) captan los cambios en su medio ambiente mediante sistemas sensoriales de transducción de señales llamados de "2-componentes". En su forma más simple, están constituidos por una proteína quinasa de membrana que actúa como sensora de la señal ambiental y un segundo componente fosforilable por el primero, denominado regulador de la respuesta. En las bacterias existen múltiples vías sensoriales reguladas por este tipo de sistemas. Por ejemplo, en el sistema sensorial de *Escherichia coli* para responder frente a la hambruna de fosfato, el sensor es la proteína PhoR y el regulador de la respuesta es el factor transcripcional PhoB. Los sistemas sensoriales del dominio *Arquea* en cambio, se desconocen. Sin embargo, existe cierta evidencia que al menos en el grupo de las halófilas extremas, parte de su sistema fototático es similar al sistema quimiotático bacteriano. Nos interesamos en la naturaleza de los sistemas sensoriales en *Arquea*, y para ello escogimos estudiar la respuesta adaptativa del arqueon *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 (reino *Crenarqueota*) frente a la hambruna de fosfato.

Empleamos electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida y marcación de las células con [<sup>35</sup>S]metionina o H<sub>3</sub><sup>32</sup>PO<sub>4</sub>. Los ensayos de Southern-blot se hicieron empleando sondas de oligonucleótidos marcadas con <sup>32</sup>P, seguido de autoradiografía.

Localizamos varias proteínas que cambian su nivel de síntesis en ausencia de fosfato y otras que modifican su grado de fosforilación en tal condición. Entre estas últimas se encuentra una proteína de 38 kDa, que se fosforila sólo en hambruna de fosfato. Mediante ensayos de Southern-blot y ocupando sondas de regiones muy conservadas de los genes *phoR* y *phoB* de *E. coli*, encontramos hibridización positiva con el DNA genómico de *S. acidocaldarius* BC65. Estos resultados sugieren la posibilidad de que en *S. acidocaldarius* exista un sistema regulador de 2-componentes para responder frente a la falta de fosfato, y constituyen la primera evidencia de la posible existencia de estos sistemas de transducción de señales en el dominio *Arquea*.

Financiado por Proyectos SAREC, FONDECYT 194/0379 y 2950019.

**74 - ACTIVACION TRANSCRIPCIONAL DE GENES MEDIADA POR ACIDO SALICILICO EN TABACO.** (Gene transcriptional activation mediated by salicylic acid in tobacco). STANGE, C. y HOLUIGUE, L. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Las plantas poseen genes de defensa inducibles, cuyos productos participan en inhibir el crecimiento y limitar la propagación de microorganismos patógenos desde el sitio primario de infección. La activación transcripcional de dichos genes requiere el reconocimiento molecular del patógeno en la superficie de la célula vegetal.

Se ha identificado la participación de etileno, ácido jasmónico,  $H_2O_2$  y ácido salicílico (SA) en las vías que transducen la señal de reconocimiento del patógeno desde la superficie al núcleo de la célula vegetal. SA, cuyos niveles endógenos aumentan durante la reacción de defensa, participa en la inducción de un grupo de genes denominados genéricamente PR (relacionados con patogénesis).

Recientemente se ha identificado que la secuencia de 21pb denominada *as-1*, presente en el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, responde a SA. En efecto, el tratamiento con SA provoca activación de la transcripción del gen reportero -glucuronidasa bajo control de la secuencia *as-1* en plantas transgénicas de tabaco. La transcripción del gen reportero no requiere síntesis *de novo* de proteínas, lo cual sugiere que el efecto de SA podría ser una modificación en la actividad de factores de transcripción ya existentes en el núcleo.

Con el propósito de determinar si SA provoca cambios en el estado de fosforilación de proteínas, se realizaron ensayos de unión *in vitro* de la secuencia *as-1* a factores de transcripción presentes en extractos nucleares de tabaco. En estos ensayos se utilizó como sonda el dímero de la secuencia *as-1*. Un aumento en los niveles de fosforilación de los extractos nucleares, utilizando caseína quinasa purificada y ATP o sólo ATP, provoca un aumento en la actividad de unión de factores de transcripción a *as-1*, detectado en geles de retardo. Por otra parte, extractos provenientes de plantas tratadas con SA muestran una mayor actividad de unión que aquellos provenientes de plantas no tratadas. Experimentos controles indican que SA no afecta directamente la actividad de unión. Estos resultados sugieren que SA podría actuar activando una proteína quinasa nuclear, la cual fosforila el factor de transcripción o alguna proteína que se une a éste, provocando un aumento en la capacidad de unión del factor. Actualmente se intenta corroborar esta hipótesis de trabajo utilizando tratamiento con fosfatasa.

Por otra parte, experimentos de competencia indican que *tca*, otro elemento de 10pb que se ha descrito que responde a SA, es capaz de desplazar la unión de *as-1* a factores nucleares. Ambas secuencias presentan un comportamiento similar frente a cambios en estados de fosforilación. Estos resultados sugieren que ambos elementos reconocerían al mismo factor de transcripción. Estas evidencias serán complementadas con experimentos de entrecruzamiento.

Financiado por Proyecto FONDECYT 563/93.

**75 - LA INDUCCION DE LA AGREGACION DEL AMILOIDE POR LA ACETILCOLINESTERASA DEPENDE DE LA ESTRUCTURA DEL PEPTIDO- $\beta$ -AMILOIDE.** (The induction of amyloid aggregation by acetylcholinesterase depends on the structure of the amyloid- $\beta$ -peptide). ALVAREZ, A.R.\* e INESTROSA, N.C. Depto. de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile.

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por la presencia de placas seniles. Su principal componente es el péptido  $\beta$ -amiloidé (Ab). En ellas se localizan otros elementos como las colinesterasas (AChE y BuChE). En nuestro laboratorio se han iniciado estudios tendientes a conocer la participación de las colinesterasas en la EA.

Utilizando el método de fluorescencia con tioflavina T, hemos cuantificado la capacidad de la AChE de agregar distintos péptidos A $\beta$ . Los péptidos estudiados presentan diferencias en su capacidad de agregar y en el contenido de hoja- $\beta$  y poseen sustituciones aminoacídicas en Val<sub>18</sub>  $\rightarrow$  Ala (A $\beta$ "A") y en Glu<sub>22</sub>  $\rightarrow$  Gln (A $\beta$ "Dutch"). Los resultados obtenidos indican que cantidades catalíticas de la AChE aceleran el proceso de agregación de los péptidos que presentan un menor contenido de estructura hoja- $\beta$ . También encontramos diferencias en la capacidad de los distintos péptidos de unirse a la AChE, péptidos con menor capacidad agregante y menos contenido de estructura hoja- $\beta$ , presentan una mejor interacción con la AChE. Nuestros resultados indican que la interacción de AChE con el péptido A $\beta$  dependería de la estructura secundaria adoptada por el dominio N-terminal del péptido y de zonas de la enzima que se encuentran presentes en la AChE y no en la BuChE.

(\*Becaria CONICYT y financiado por FONDECYT N° 1940694).

**76 - ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE LA SUBUNIDAD  $\alpha'$  DE LA PROTEÍNA QUINASA CK 2.** (Biochemical studies of  $\alpha'$  subunit of protein kinase CK2). ANTONELLI, M ROJO, D., DANIOTTI, J. y ALLENDE, J. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La proteína quinasa CK2 tiene una amplia distribución en eucariontes. Ella se encuentra en forma de heterotetrámeros formados por dos tipos de subunidades  $\alpha$  ( $\alpha$  o  $\alpha'$ ) y por dos subunidades  $\beta$ . Las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  poseen el sitio catalítico. La subunidad  $\beta$  al asociarse con  $\alpha$  o  $\alpha'$  estimula la actividad de a. Las subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$  presentan secuencias proteicas muy conservadas a lo largo de la escala evolutiva. La mayor parte de los estudios realizados sobre la interacción entre las subunidades catalítica y regulatoria han sido realizados exclusivamente con  $\alpha$  y  $\beta$ , existiendo un solo estudio que utilizó la subunidad  $\alpha'$ . En el presente trabajo se informan los resultados obtenidos al estudiar algunas características bioquímicas de la subunidad  $\alpha'$  recombinante obtenida mediante la expresión del cDNA proveniente de una genoteca de pez cebra en *E. coli*. Nuestros resultados indican que  $\alpha'$  recombinante se asemeja mucho a la subunidad  $\alpha$  recombinante de *Xenopus laevis* en lo referente a sus Km aparentes para ATP, GTP caseína y péptido substrato. Las propiedades de  $\alpha'$  se asemejan también a las de  $\alpha$  con respecto a los efectos de fuerza iónica y de metales. Sin embargo,  $\alpha'$  tiene un comportamiento diferente con respecto a  $\alpha$  en lo referente a la inhibición por ácido poliurídilico.

(Apoyado por FONDECYT, The Council for Tobacco Research y ICEGEB).

**77 - EFECTO DEL VINO SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA.** (Effect of wine on Plasma Antioxidant Capacity). CASTRO, R.C., BARRIGA, C. y LEIGHTON, F. Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, P. Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

El plasma contiene numerosos compuestos antioxidantes en la fracción hidrosoluble, y unidos a lipoproteínas. Muchos métodos experimentales se utilizan actualmente en la determinación de cada uno de ellos. La capacidad antioxidante total del plasma (CAP) puede medirse por el análisis del Potencial Antioxidante Reactivo Total (TRAP), descrito por Lissi E.A. y col. (Free Rad. Biol. Med. 18, 153-158, 1995). Además de los antioxidantes plasmáticos clásicos, podrían haber otros compuestos de origen natural que estén contribuyendo al CAP, que pueden ser aportados por los alimentos. El vino tinto contiene compuestos fenólicos capaces de actuar como antioxidantes (aproximadamente 2 g/l), siendo parte importante de ellos el grupo de los flavonoides. Previamente estudiamos *in vitro* el efecto antioxidante de algunos de estos flavonoides y de vino tinto, encontrando que son antioxidantes tan buenos o mejores que vitamina E.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del vino tinto sobre los antioxidantes plasmáticos. Se estudió el efecto sobre los antioxidantes vitamina E, vitamina C y  $\beta$ -caroteno, y sobre la CAP; y se analizaron los niveles de Catequina alcanzados en plasma, descrito como el flavonoide mayoritario en vino tinto. Para esto se suplementaron 10 voluntarios con 400 ml de vino. No se observaron cambios en los niveles de vitamina E y de vitamina C, pero la CAP, medida como TRAP, aumentó entre un 2% y un 10% con respecto a la basal. Fue posible detectar Catequina en el plasma de los sujetos suplementados, observándose alta variabilidad en la cinética de absorción o niveles plasmáticos. No existe correlación entre los niveles de Catequina plasmática alcanzados por los sujetos suplementados con vino tinto y el TRAP de las mismas muestras de plasma.

Concluimos que la suplementación con vino tinto contribuye a un aumento en la capacidad antioxidante del plasma; y que Catequina no es el responsable principal del efecto observado, sino que existen otros compuestos cuya contribución a la capacidad antioxidante del vino, y en consecuencia, al aumento de la capacidad antioxidante del plasma, parece ser más importante.

Como hemos establecido antes, las LDL son estabilizadas *in vitro* por vino tinto, por lo que estos resultados tienen importancia en el marco de la Hipótesis Oxidativa de la Aterogénesis.

(Financiado por proyecto FONDECYT 666/94).

**78 - CAMBIOS CONFORMACIONALES DE CALSECUESTRINA, UNA PROTEÍNA INTRARRETICULAR, DEPENDIENTES DE  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  Y pH.** RODRÍGUEZ, P. DONOSO, P. e HIDALGO, C. Depto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, U. de Chile, y C.E.C.S.

La calsecuestrina es la principal proteína intraluminal del retículo sarcoplasmático (RS) de músculo esquelético. Tiene una gran capacidad de unión de calcio, 40-50 moles/mol de proteína, con una afinidad de 1 mM. Recientemente se ha propuesto que la calsecuestrina, que está localizada en las cisternas terminales del RS, podría controlar la apertura de los canales de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático.

La unión de calcio produce un gran cambio conformacional de la calsecuestrina, aumentado su contenido de alfa-hélice, lo que provoca un aumento de su fluorescencia intrínseca. En este trabajo hemos estudiado, usando calsecuestrina purificada, el efecto del pH y de los iones potasio sobre los cambios de fluorescencia intrínseca inducidos por calcio.

Encontramos que el aumento de  $[H^+]$  o de  $[K^+]$  produce aumentos de fluorescencia semejantes a los producidos por calcio. Dependiendo de las  $[H^+]$  o de  $[K^+]$ , el aumento de fluorescencia inducido por calcio es o no cooperativo; el n de Hill aumenta en forma inversa con las concentraciones de estos iones.

Proponemos que los sitios que unen calcio en la calsecuestrina pueden unir también  $K^+$  o  $H^+$ , los que inducen en la proteína los mismos cambios conformacionales que el calcio. Estos resultados sugieren que al liberarse calcio del RS, éste podría ser reemplazado por  $H^+$  o por  $K^+$ , manteniendo a la proteína en una conformación similar a la que posea antes de liberar el calcio.

Financiado por FONDECYT 1931053 y FONDECYT 1940369.

**79 - IDENTIDAD DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE ACIL-COENZIMO A TIOESTERES DE CARCINOGENOS NO-GENOTOXICOS EN CITOSOL DE HIGADO DE RATA.** (Identity of binding sites of acyl-coenzyme A thioesters of nongenotoxic carcinogens in rat liver cytosol). SILVA, C.O., URREA, R., LOYOLA, G., y BRONFMAN, M., Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Los proliferadores peroxisomales con actividad carcinogénica no-genotóxica abarcan un amplio grupo de xenobióticos, que incluyen drogas hipolipídicas, plastificantes, herbicidas y agroquímicos, solventes industriales y otros contaminantes ambientales. Los efectos farmacológicos de estos compuestos dependen de la especie. En la rata, se manifiesta por una marcada proliferación peroxisomal hepática, aumento del número y tamaño de mitocondrias, hepatomegalia, aumento de P450 específico para la hidroxilación de ácidos grasos, hipolipidemia, y cambios en los niveles de metabolitos como el coenzimo A y la carnitina, así como sus ésteres con ácidos grasos. El tratamiento a largo plazo resulta en la aparición de tumores hepáticos, por un mecanismo no genotóxico, ya que estos compuestos no interactúan con el DNA. En humanos, su acción es menos conocida, aunque hay evidencias de que no hay proliferación peroxisomal, aunque sí efecto hipolipídico. El conocimiento del mecanismo de acción de estos compuestos es importante para estimar el riesgo de su uso en humanos. En nuestro laboratorio hemos determinado que estos xenobióticos, de estructura química diversa, tienen en común la presencia de grupos carboxílicos, los que forman tioésteres con el coenzimo A. Hemos postulado que el agente farmacológicamente activo de estos xenobióticos es el acil-Coenzimo A derivado formado metabólicamente. Los xenobióticos-CoA son formados muy rápidamente por el hígado, inhiben las vías peroxisomales y mitocondriales de  $\beta$ -oxidación, con posible acumulación de sustratos, y potencian la actividad de la proteína quinasa C. Usando  $^3H$ -nafenopin-CoA hemos demostrado la presencia de proteínas específicas de unión de xenobióticos-CoA en hígado de rata, las que no unen las drogas no activadas, con pesos moleculares de 10-12 kDa y 35-40 kDa. En este trabajo se reporta la posible identidad de estas proteínas. Mediante técnicas convencionales de purificación y el uso de anticuerpos específicos, hemos encontrado que las proteínas de bajo peso molecular corresponden a una proteína específica de transporte de acil-CoAs (ACBP), descrita recientemente. El desplazamiento de los ligandos endógenos de ACBP por xenobióticos-CoA podría estar involucrado en la acción farmacológica de estos xenobióticos. Por otra parte, hemos encontrado que las proteínas de 35-40 kDa que unen  $^3H$ -nafenopin-CoA aparecen en la fracción de las glutatión transferasas, proteínas para las cuales no estaba descrita la capacidad de unir acil-CoAs.

(Financiado por Fondecyt 685-94)

**80 - LA PROTEINA TAU SE ASOCIA A LOS CENTROSOMAS EN DIFERENTES TIPOS CELULARES.** (Tau protein associates to centrosomes in different cell types). TAPIA, L.<sup>1</sup>, CROSS, D.<sup>2</sup>, GARRIDO, J.<sup>2,3</sup> y MACCIONI, R.B.<sup>1,2</sup> Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, International Center for Cancer and Develop. Biology (ICC) y P. Universidad Católica de Chile.

Tau, uno de los componentes principales de la familia de las MAPs, estabiliza microtúbulos, interactúa con filamentos de actina y está involucrado en la formación de los filamentos pareados helicoidales en la enfermedad de Alzheimer. A pesar del mayor conocimiento que ahora se tiene sobre la estructura de tau, aún no se conocen bien sus funciones *in vivo*. Hemos generado anticuerpos policlonales anti-tau, y anticuerpos sitio-dirigidos contra péptidos con las secuencias repetitivas en tau, y analizamos su organización subcelular en células en cultivo. Estudios inmunocitoquímicos usando dichos anticuerpos revelaron que isoformas de tau colocalizan con microtúbulos y con fibras de tipo estrés. Se observó la localización de isoformas de tau con centrosomas en células de neuroblastoma, en fibroblastos humanos y células de hepatoma humano Huh-7. Anticuerpos dirigidos contra la primera secuencia repetitiva en tau no marcaron centrosomas. Tau fue también identificada mediante inmunotransferencias en preparaciones purificadas de centrosomas, obtenidas por centrifugación diferencial. Los resultados sugieren un significado estructural para estas interacciones. Se postula que tau podría contribuir a la estabilización del centrosoma, y que su interacción estaría regulada por su nivel de fosforilación.

(Financiado por FONDECYT y por UICC).

**81 - TRANSPORTE INTRAHEPÁTICO DE COLESTEROL: LA PROTEINA-2 TRANSPORTADORA DE ESTEROLES (SCP-2) PARTICIPA EN SU TRANSPORTE DESDE EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO A LA BILIS.** (Intrahepatic cholesterol transport: sterol carrier protein-2 is involved in its transfer from the endoplasmic reticulum into bile). PUGLIELLI, L., RIGOTTI, A., AMIGO, L., NÉNEZ, L., GRECO, A., SANTOS, M. y NERVI, F. Depto. de Gastroenterología y Centro para la Prevención y Tratamiento del Cáncer Digestivo, Facultad de Medicina, Depto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile y Facultad de Medicina e Cirugía, Università Cattolica del S. Cuore, Roma Italia.

El colesterol biliar se origina de un pool precursor que contiene colesterol preformado y colesterol libre de neosíntesis hepática. Aunque se ha sugerido que ambos tipos de colesterol son secretados a la bilis por vías intrahepáticas independientes, los mecanismos celulares involucrados son aún desconocidos. Hemos estudiado el curso temporal de la aparición de colesterol de neosíntesis, fosfatidilcolina y proteína en la bilis de ratas Wistar machos, en presencia o en ausencia de drogas disruptivas de microtúbulos o del aparato de Golgi. El papel específico de SCP-2 en el transporte biliar de colesterol de neosíntesis fue investigado mediante la administración *in vivo* de oligonucleótidos antisense. A diferencia de lo observado para fosfatidilcolina 14C y proteínas 35S, el curso temporal de aparición biliar de colesterol 14C fue rápido, e independiente de la integridad de microtúbulos y Golgi. La administración de oligonucleótidos antisense de SCP-2 aumentó significativamente y el transporte de colesterol marcado se hizo parcialmente dependiente de microtúbulos y golgi en animales con secreción aumentada de colesterol de neosíntesis. Estos resultados sugieren que SCP-2 participa en el transporte hepático de colesterol desde el retículo endoplásmico a la bilis, y que al aumentar la secreción biliar de colesterol de neosíntesis, los hepatocitos pueden inducir la expresión de SCP-2 y reclutar o expandir una vía más lenta dependiente de microtúbulos y Golgi.

(Financiamiento FONDECYT N° 1940620 y N° 1940686).

**82. ACTIVIDAD ECTO-ATP DIFOSFOHIDROLÁSICA EN PLACENTA HUMANA** (Ecto-ATP diphosphohydrolase activity in human placenta) Valenzuela M.A., Ketlun A.M., García L., Acevedo C.G., Bravo I., Espinoza V., Collados L., Mancilla M., Chayet L., Traverso-Cori A. Depto. de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

La actividad ATP-difosfohidrolásica o apirásica de placenta humana parece tener una función relevante en la modulación del flujo sanguíneo por su actividad ADPásica (inhibe la agregación plaquetaria). Si la apirasa tuviera esa función debiera tener una localización tipo ectoenzima. El objetivo ha sido demostrar que esta enzima tiene esta localización en la circulación materna (microvellosidades placentarias) y fetal (vascularización).

Se preparó microvellosidades placentarias (vesículas que conservan la misma orientación que en la célula entera), encontrándose que la actividad apirásica no aumentaba al agregar digitonina o saponina y otros detergentes no iónicos, indicando que es una ectoenzima.

Se preparó anticuerpos contra la apirasa del lado materno (sinciotrofoblasto) purificando la enzima por isoelectroenfoque (pI 5,4) y SDS-PAGE. Se inyectó a conejos la banda de proteínas de Mr 62 kDa (masa de la apirasa nativa) obtenida después de electrotransferir a las proteínas separadas por SDS-PAGE a nitrocelulosa. Los anticuerpos producidos reaccionaron con la banda de la misma masa molecular de las microvellosidades al efectuar «inmuno western blot».

La presencia de apirasa en la vascularización fetal se estudió perfundiendo con ATP y ADP. Se observó inhibición en la aparición de Pi al coperfundir con análogos no hidrolizables de estos nucleótidos. La perfusión en presencia de anticuerpos produjo bloqueo de la hidrólisis de ATP y ADP, confirmando la existencia de la enzima localizada en la vascularización como ectoenzima.

Por estos resultados proponemos que la apirasa regularía los niveles extracelulares de los nucleótidos produciendo adenosina al actuar en conjunto con la 5'-actonucleotidasa.

Financiado con Proyecto DTI B3345-9433

INDICE

**A** ..... N° Res.

Accatino, L. .... 59

Acevedo C.G. .... 82

Aguirre, C. .... 46

Alvarez, A.R. .... 75

Allende, J. .... 76

Alliende, C. .... 9

Amigo, L. .... 59, 81

Amthauer, R. .... 67

Andrade, L. .... 59

Antonelli, M. .... 76

Arias, J.L. .... 38

Arredondo, M. .... 40

**B**

Babul, J. .... 63

Barriga, C. .... 77

Barriga, F. .... 50

Baudo, M. .... 66

Bazaes, S., .... 19

Becker, A. .... 50

Beressi, V. .... 50

Berrocal, L. .... 65

Bize, I. .... 36

Brandan, E. .... 3, 7

Brañes, M.C. .... 13

Bravo I. .... 82

Bravo, M. .... 11

Brevis, P. .... 45

Bronfman, F.C. .... 14

Bronfman, M. .... 25, 70, 79

Bull, P. .... 32

Bull, R. .... 31, 34

Burzio, V. .... 25

Bustos, P. .... 44

**C**

Cabello, A. .... 5

Cabrera, M.E.P. .... 50

Cáceres, S., .... 27

Calderón, F. .... 39

Campbell, M. .... 50

Canessa, M. .... 12, 37

Cárcamo, J.G., .... 41

Cardemil, E. .... 15, 19

Cárdenas, L. .... 70

Carvalho, P. .... 49, 55

Castañeda, P. .... 26

Castillo, C. .... 46

Castro, R.C. .... 77

Cifuentes, V. .... 28

Collados L. .... 82

Contreras, M. .... 3

Cordano, G. .... 65

Cross, D. .... 80

Curotto, E. .... 46

**CH** ..... N° Res.

Chaimovich, H. .... 71

Chayet L. .... 82

Chianale, J. .... 59

**D**

Dabike, M. .... 25

Daniotti, J. .... 76

Delgado, M. .... 16

Díaz R. .... 18

Donoso, P. .... 78

Dunham, P.B. .... 36

Durán, N. .... 46

**E**

Espinoza, I. .... 42

Espinoza V. .... 82

Eyzaguirre, J. .... 18

**F**

Fanta, N. .... 54

Fardella, C. .... 52

Faúndez, V. .... 9, 22

Fellous, M. .... 72

Fernández, J. M. .... 24

Fernández, M.S. .... 38

Ferreira, J. .... 65

Figueroa, C. .... 2

Figueroa, J. .... 56

Flawiá, M.M. .... 21

Freire, M. .... 5

Fuentes, O. .... 69

**G**

Gajardo, M.I. .... 44

Galanti, N. .... 1, 17, 42, 58, 60

Galindo, M. .... 1, 17

Gálvez, M. .... 5

García L. .... 82

García, M.A. .... 3

Garrido, J. .... 5, 80

Godoy, N. .... 19

Goicoechea, O. .... 67

Gómez, C. .... 44

Gómez, I. .... 27

González, A. .... 9, 11, 22, 32

González, L.F. .... 20

González, S. .... 59

González, B. .... 9

Greco, A. .... 81

Guerrero, A. .... 65

Guerrero, N. .... 10

Guixé, V. .... 61, 63

<b>H</b> .....	Nº Res.
Heino, P. ....	66
Hellman, U. ....	42, 58
Herrera, L. ....	23
Hidalgo, C. ....	31, 34, 78
Hidalgo, P. ....	25
Holuigue, L. ....	74
Hubert, E. ....	45
<b>I</b> .....	
Inestrosa, N.C. ....	14, 39, 75
Israel, Y. ....	62
<b>J</b> .....	
Jabalquinto, A.M. ....	19, 44
Jara, A. ....	55
Jerez, C.A. ....	16, 73
Jordana, X. ....	33
<b>K</b> .....	
Kausel, G. ....	56
Kessi, E. ....	61
Ketlun A.M. ....	82
Krauskopf, M. ....	56
Krautwurst, H. ....	15
<b>L</b> .....	
Larraín, J. ....	7, 57
Larrondo, L. ....	57
Legües, M.E. ....	50
Leighton, F. ....	48, 77
León, O. ....	41
Lobos, O. ....	45
Lobos, S. ....	28, 57
López, R. ....	9
Loyola, G. ....	79
Ludwig, H. ....	43
Luxoro, C. ....	28
<b>M</b> .....	
Maccioni, R.B. ....	80
Mancilla, A. ....	10
Mancilla M. ....	82
Mann, G.E. ....	35, 69
Manríquez, E. ....	12
Marengo, J.J. ....	31, 34
Martínez, A. ....	6
Martínez, C. ....	10
Martínez, J. ....	4
Marzolo, M.P. ....	32
Maya, J.D. ....	29
Mayor, R. ....	10
McElreavey, K. ....	72
Melo, F. ....	3
Mericq, V. ....	55
Messen, L. ....	5
Meza-Basso, L. ....	66
Meza-Zepeda, L. ....	66
Miller, W. ....	52

.....	Nº Res.
Miranda, D. ....	8
Missarelli, M. ....	55
Molina, A. ....	56
Monasterio, O. ....	30
Moncada, C. ....	62
Montecinos, L. ....	19
Montero, J. ....	52
Morello, A. ....	29
Muñoz, P. ....	68
Muñoz, S. ....	65
<b>N</b> .....	
Navarro, J. ....	28
Nervi, F., ....	59
Norambuena, L. ....	53
Neñez, L. ....	81
Núñez, M.T. ....	40
<b>O</b> .....	
O'Reilly, S. ....	47
Oberhauser, A.F. ....	24
Olate, J. ....	23
Opazo, E. ....	29
Orellana, A. ....	53, 68
Ormazabal, A. ....	5
Ortolani, D. ....	12
Ortolani, O. ....	37
Osorio, G. ....	73
<b>P</b> .....	
Padilla, C. ....	45
Palva, T. ....	66
Pavani, M. ....	65
Peirano, A. ....	18
Pérez, C.F. ....	31
Pérez, F. ....	20
Pérez, L.M. ....	26, 28, 54
Pezoa, J. ....	65
Pizarro, M., ....	59
Ponce, C. ....	25
Preller, A. ....	61
Puente, J. ....	8
Puglielli, L. ....	81
<b>R</b> .....	
Repetto, Y. ....	29
Reyes, A.M. ....	41, 43
Rigotti, A. ....	59, 81
Ríos, J. ....	51
Risueño, C. ....	50
Riveros, N. ....	51
Rodríguez, H. ....	52
Rodríguez, P. ....	30, 78
Rojas, M.C. ....	20
Rojas, S. ....	70
Rojo, D. ....	76
Roseblatt, M. ....	72
Rosenmann, E. ....	12, 37



<b>S</b> .....	Nº Res.
Sabaj, V. ....	60
Sáez, D. ....	2
Sáez, J.C. ....	6, 13
Salas, L. ....	72
Salgado, C. ....	50
Santos, M. ....	81
Santibáñez, J.F. ....	4
Sapag, A. ....	64
Seelenfreund, D. ....	28
Silva, C.O. ....	79
Silva, S. ....	4
Slebe, J.C. ....	2, 41, 43
Sobrevia, L. ....	35, 69
Stange, C. ....	74
Steiner, J. ....	18

<b>T</b>	
Tapia, L. ....	80
Tapia, V. ....	40
Tobar, L. ....	67
Toledo, H. ....	16
Toro, G.C. ....	42, 58
Torres, J.C. ....	63
Traverso-Cori A. ....	82

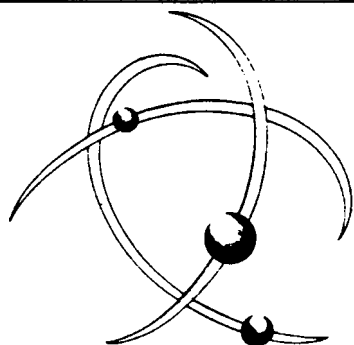
<b>U</b>	
Ureta, T. ....	61
Urrea, R. ....	79
Urzúa, U. ....	57

<b>V</b> .....	Nº Res.
Valenzuela M.A. ....	82
Valle, D. ....	64
Vargas, L. ....	70
Varghese, G. ....	62
Venegas, A. ....	27
Vera, M.I. ....	56
Vicuña, R. ....	57
Vignolo, P. ....	52
Vollrath, V. ....	59

<b>W</b>	
Weber, M. ....	47
Werner, E. ....	11, 22
Wernstedt, C. ....	58
Wielandt, A.M. ....	59

<b>Y</b>	
Yudilevich, D.L. ....	35

<b>Z</b>	
Zanlungo, S. ....	33
Zhan, G.G. ....	52



**PARRAGUEZ & TAHA S.A.**  
INSTRUMENTACION  
CIENTIFICO - TECNOLÓGICA

**INNOVACION TECNOLÓGICA Y  
CONFIABILIDAD SE APOYAN  
EN UN SERVICIO TECNICO CON  
28 AÑOS DE EXPERIENCIA EN  
EL RUBRO.**

**A. ACEVEDO Y CIA. LTDA.  
SERVICIO TECNICO**

**KUBOTA**

- Centrifugas de Sobremesa
- Centrifugas Refrigeradas
- Microcentrifugas

**NUAIRE**

- Ultracongeladores -85° C
- Congeladores -40° C
- Campanas de Flujo Laminar
- Incubadoras CO<sub>2</sub>

**BIO-RAD**

- Electroforesis
- ELISA
- Cromatografía de HPLC

**CECIL**

- Espectrofotómetros UV/Visible
- Espectrofotómetros UV de Barrido
- Espectrofotómetros de Doble Haz
- Sistemas de HPLC

**WTW**

- Ph-metros
- Conductívimetros

**MVE**

- Criopreservación

**BLUEM**

- Baños de agua
- Estufas universales
- Mufias

**SEILER**

- Microscopios y accesorios
- Microfotografía
- Lupas Estereoscópicas
- Sistemas TV alta resolución

**ionetics**

- Analizadores de Electrólitos

