

## SAIC RESUMENES DE LAS COMUNICACIONES ORALES

### REPRODUCCION I

- 1. Evaluación del efecto de los fluidos de hydrosalpinx sobre el desarrollo del blastocisto de ratón en relación con los niveles de citoquinas.** Elisa Puigdomenech<sup>1</sup>, Roberto Inza<sup>1</sup>, Marisa Tiveron<sup>1</sup>, Alejandra Piazza<sup>1</sup>, Edgardo Young<sup>1</sup>, Rosa I. Barañao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ginecología y Fertilidad, <sup>2</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental -CONICET, Buenos Aires.

El objetivo del presente estudio fue evaluar si el fluido de hydrosalpinx (FHx) produce un microambiente adverso para el desarrollo embrionario y si existe relación con los niveles de IL-2, INF $\gamma$ , IL-4 e IL-10. Se evaluaron 13 FHx los cuales fueron centrifugados y mantenidos a -196 °C hasta su uso. Para la evaluación del efecto de los FHx sobre el desarrollo de blastocistos de ratón se emplearon por ensayo un promedio de 15 embriones de Balb/c en el estadio de 2 células en medio HTF suplementado con 0%, 30% y 100% de FHx. Los cultivos se controlaron diariamente hasta el día 5 para verificar el desarrollo de blastocistos. Los niveles de citoquinas se cuantificaron con kits de ELISA comerciales. Como controles se evaluaron 10 muestras de líquidos peritoneales (LP) de pacientes sin Hx ni endometriosis. Los FHx al 30% produjeron un efecto inhibitorio en la blastulación en el 62% de las muestras, un efecto estimulador en el 31% de las muestras y un 8% de las mismas no alteró el desarrollo embrionario. Cuando se emplearon los FHx puros el 92% de las muestras inhibió la blastulación mientras que un 8% la aumentó. Estos datos no difieren de los obtenidos con LP controles. No se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-2 ni INF $\gamma$  entre FHx ni LP, sin embargo se observó que ninguno de los LP presentaba niveles detectables de IL-4 ni IL-10 mientras que si se detectó IL-4 en 5/7 FHx e IL-10 en 3/13 FHx. Por lo tanto no existiría relación entre niveles de citoquinas en FHx y desarrollo embrionario. No se descarta la posibilidad de que el efecto inhibitorio de estos FHx pueda deberse a alteraciones de pH, osmolaridad o a la ausencia de nutrientes esenciales.

- 2. El desarrollo preimplantatorio de embriones bovinos requiere de la actividad de la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide-dehidrogenasa.** Eugenia Chiappe, Lino Barañao, Patricia Saragüeta

*Instituto de Biología y Medicina Experimental y Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.*

El adecuado desarrollo de embriones de mamíferos requiere tanto de la regulación génica del propio embrión como de la regulación epigenética producida por el tracto reproductivo. Se sabe que los esteroides maternos son fundamentales para establecer y mantener la preñez, y que los embriones producen esteroides; sin embargo no se conoce su función durante el período preimplantatorio. Con el objetivo de investigar la regulación autócrina durante este período se ensayó la actividad de una enzima clave en el camino esteroideogénico, la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide-dehidrogenasa/ $\Delta^5$  isomerasa (3 $\beta$ -HSD). Se observó una acentuada disminución en el porcentaje de embriones positivos en el estadio de 4-células (ovocitos maduros: 74  $\pm$  1%, 1-cel: 73  $\pm$  6%, 2-cel: 62  $\pm$  7%, 4-cel: 17  $\pm$  5%, 8-cel: 50  $\pm$  5%, morula: 51  $\pm$  36%,

blastocistos: 94  $\pm$  3% y blastocistos eclosionados: 100  $\pm$  0%). La presencia de ARN mensajeros específica para 3 $\beta$ -HSD bovina, mostró resultados coherentes con los observados para la actividad enzimática. Por otra parte se analizó la producción de esteroides, para lo cual embriones en el estadio de blastocistos se incubaron en presencia de <sup>3</sup>H-pregnenolona. Los medios de cultivo se analizaron por cromatografía en capa delgada, observándose la aparición de un metabolito con Rf similar a progesterona. Para estudiar la posible función de la progesterona (P4) producida por el embrión se incubaron embriones de 2-células en presencia de un inhibidor (cykn) de la 3 $\beta$ -HSD, lo que produjo una disminución significativa en la progresión del desarrollo (control: 25  $\pm$  4%, cykn: 7  $\pm$  2%). La presencia de progesterona revirtió el efecto producido por el inhibidor (P4 + cykn: 29  $\pm$  4%) mientras que la presencia de otro metabolito no progestágeno, 5 $\beta$ -pregnan 3,20-diona (5 $\beta$ ) no produjo cambios significativos (5 $\beta$ : 9.5  $\pm$  1.5%). En este trabajo describimos por primera vez la expresión de la enzima 3 $\beta$ -HSD en embriones bovinos y demostramos que la actividad de la enzima 3 $\beta$ -HSD embrionaria sería necesaria para la adecuada progresión del desarrollo preimplantatorio.

- 3. Estudio de la relación entre la estructura y la actividad de la proteína epididimaria DE.** Diego Ellerman, Débora Cohen, Mauro Morgenfeld, Vanina Da Ros, Dolores Busso, Patricia S. Cuasnicú

*Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Buenos Aires.*

La proteína de espermatozoide de rata "DE" participa en la etapa de fusión de gametas a través de sitios de unión en el ovocito. DE es una glicoproteína de 227 aa y contiene 16 cisteínas formando puentes disulfuro (S-S) intramoleculares. El objetivo del presente trabajo consistió en analizar la relación entre la estructura y la actividad de DE. La participación de los azúcares se analizó utilizando DE expresada en bacterias (recDE), y DE deglicosilada. La preincubación de ovocitos con ambas proteínas inhibió (p<0.05) el % de fusión (recDE 28%, DE-deglic 14%, control 85%), al igual que ocurre con DE nativa no tratada (16%). La importancia de los S-S, se estudió utilizando DE reducida y alquilada (DERed), la cual también inhibió el % de fusión (p<0.05) respecto del control (49% vs 84%). Finalmente, con el fin de identificar la región por la cual DE se une al sitio complementario, ovocitos sin zona fueron expuestos a distintos fragmentos recombinantes [F1 (aa 1-158), F2 (156-227), F3 (62-227) y F4 (62-158)] y sometidos a inmunofluorescencia indirecta. La incubación con F1, F3 y F4, pero no con F2 o con MBP (proteína control), resultó en ovocitos con marca fluorescente. Se puede concluir que a) la actividad de DE residiría básicamente en la región peptídica de la molécula, b) los puentes disulfuro estarían involucrados en dicha actividad, y c) el sitio de unión al ovocito se encontraría en la región comprendida entre los aa 62 -158.

- 4. Acciones comparativas de TGF- $\beta$  y activina en el crecimiento y diferenciación de células de la granulosa.** Guillermo Lanuza, Lino Barañao

*Instituto de Biología y Medicina Experimental; Departamento de Química Biológica, FCEyN, Universidad de Buenos Aires*

El TGF- $\beta$  y la activina son factores pertenecientes a la misma superfamilia de péptidos que compartirían mecanismos de señal-

lización celular. En el presente trabajo se analizó la posibilidad que estos factores ejerzan acciones diferenciales en la regulación de la diferenciación y el crecimiento de células de la granulosa. Activina A y TGF- $\beta$ 1 amplificaron la respuesta a FSH sobre la síntesis de estradiol en similar magnitud. La folistatina, proteína ligadora de activina, bloqueó las acciones sobre la esteroidogénesis ejercidas por la activina exógena o endógena, pero no la amplificación por TGF- $\beta$  (Control:  $6.9 \pm 0.7$  vs.  $4.5 \pm 0.4$ , TGF- $\beta$ :  $16.5 \pm 0.5$  vs.  $16.7 \pm 1$ , activina  $15.2 \pm 1.2$  vs.  $5 \pm 0.8$  ng/ml estradiol, medido por radioinmunoensayo, ausencia vs. presencia de folistatina). Sin embargo, cuando se compararon los efectos de TGF- $\beta$  y activina sobre el crecimiento en células de la granulosa, ambos agonistas difirieron en la respuesta máxima promovidas (TGF- $\beta$ :  $11.1 \pm 0.6$ , activina:  $20.5 \pm 0.7$  veces de estimulación del control). Aún en presencia de TGF- $\beta$ , la folistatina ejerce acciones inhibitorias significativas, indicando la necesidad de la acción autocrina de la activina para alcanzar la máxima respuesta mitogénica. Estos resultados indican que ambos factores podrían cumplir papeles específicos en la regulación de la folicologénesis.

##### 5. Administración repetida de endotoxina (LPS) en ratas peripuberales: retraso de la apertura vaginal y modificaciones en los niveles de LHRH e interleuquina-1 (IL-1).

Carlos Feleder, Roxana Reynoso, Jaime Moguilevsky, Pablo Arias

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

**Objetivos:** estudiar el efecto de la administración repetida de LPS (entre los días 25 y 29 postparto) sobre 1) el desarrollo puberal, y 2) sobre los niveles hipotalámicos de LHRH e IL-1 y periféricos de IL-1 y estradiol (E2). **Métodos:** 18 ratas hembra (Wistar) recibieron 50  $\mu$ g/kg de LPS i.p. los días 25, 27 y 29 postparto, o salina (controles, n= 18). En 10 animales de cada grupo se evaluó la fecha de apertura vaginal; las restantes fueron decapitadas el día 30, obteniéndose sangre troncular para el dosaje de IL-1 y E2. El hipotálamo (anterior y mediobasal, AMBH) fue disecado y homogeneizado en HClO<sub>4</sub>. Medimos LHRH y E2 por RIA, e IL-1 por ELISA. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Wilcoxon para datos no apareados. **Resultados:** (promedio  $\pm$  SD) la edad promedio al alcanzar la apertura vaginal fue de  $37 \pm 4$  días y de  $31 \pm 3$  días (LPS vs. controles,  $p < 0.001$ ). En los homogenatos, los niveles de LHRH aumentaron ( $2.1 \pm 0.4$  vs.  $1.3 \pm 0.1$  pg/mg tejido;  $p < 0.0006$ ), y los de IL-1 disminuyeron ( $75 \pm 17$  vs.  $110 \pm 23$  pg/mg tejido;  $p < 0.01$ ) tras el tratamiento con LPS. En suero, observamos una caída de las concentraciones tanto de IL-1 ( $25 \pm 6$  vs.  $84 \pm 50$  ng/ml;  $p < 0.01$ ) como de E2 ( $7 \pm 3$  vs.  $20 \pm 8$  pg/ml;  $p < 0.001$ ). **Comentarios:** la administración repetida de LPS resultó en una inhibición del eje reproductor, a juzgar por el retraso en la fecha de apertura vaginal y por la caída en los niveles de E2. Dicho efecto bien puede deberse a la inhibición de la liberación de LHRH, con el consiguiente incremento a nivel hipotalámico, si bien no podemos descartar un efecto directo sobre ovario. La disminución de los niveles de IL-1 se explicaría por un agotamiento tras la estimulación prolongada de la respuesta inmune, tal como ha sido demostrado en trabajos previos con la secreción de TNF- $\alpha$ .

##### 6. Caracterización de la expresión de proacrosina humana en *Escherichia coli*. Unión de proacrosina recombinante a glicoproteínas de la zona pellucida humana.

<sup>1</sup>Laura Furlong, <sup>2</sup>Ulf Hellman, <sup>3</sup>Alejandro Krimer, <sup>1</sup>Mónica Vazquez-Levin

<sup>1</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires; <sup>2</sup>Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Suecia. <sup>3</sup>Biosidus, Buenos Aires.

Proacrosina es una proteína multifuncional localizada en el acrosoma del espermatozoide. Este estudio reporta la caracterización de la expresión de proacrosina humana en bacteria, y su capacidad de unión a glicoproteínas de la zona pellucida. El ADNc

de proacrosina humana se subclonó en los vectores pET-22b y pGEX-3X. En el sistema pGEX no se detectó la expresión de la proteína de fusión completa. En el sistema pET, se obtuvo un producto de peso molecular aparente similar al esperado para la proenzima (Rec-40, 42-44 kDa), reconocido por el anticuerpo monoclonal AcrC5F10 dirigido contra acrosina humana. Proteínas de 32-34 (Rec-30), 21 (Rec-20) y 18 kDa (Rec-10) se recuperaron en la fracción insoluble de los lisados bacterianos y no fueron reconocidas por AcrC5F10. Se detectaron productos truncados del C-terminal asociados a la fracción soluble. Rec-40 y Rec-30 coexisten a todo tiempo de inducción analizado. Suero inmune desarrollado contra Rec-30 (AntiRec-30) reconoció la región acrosomal de espermatozoides humanos permeabilizados, y detectó los productos recombinantes Rec-40, 30, 20 y 10, y proacrosina de espermatozoides humanos. Análisis de secuenciación de aminoácidos indicaron que Rec-30, 20 y 10 son fragmentos N-terminales de proacrosina. Las proteínas recombinantes Rec-40, 30, 20 y 10 mostraron capacidad de reconocimiento a glicoproteínas de la zona pellucida homóloga.

## HEMATOLOGIA

##### 7. Clodronato encapsulado en liposomas en la terapéutica de un modelo de púrpura trombocitopénica inmune (PTI).

Fernanda Alves Rosa, Carmen Stanganelli, Juana Cabrera, Nico van Rooijen, Marina Palermo, Martín Isturiz

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires; Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Vrije Universiteit, Amsterdam, Holanda*

La PTI es una patología asociada a la presencia de inmunoglobulinas asociadas a plaquetas o autoanticuerpos y su posterior destrucción por parte del sistema retículo endotelial (SRE). En este trabajo evaluamos una nueva estrategia en el tratamiento de la PTI utilizando un modelo experimental utilizando suero de conejo anti-plaquetas murinas (Ac). Una dosis diaria i.p. de Ac disminuye el recuento plaquetario de los animales tratados. Así, salina (plaquetas  $\times 10^3/\mu$ l  $\pm$  SEM):  $405 \pm 5$  vs. Ac:  $11 \pm 2$  ( $p < 0.001$ , n=25). En este modelo se estudió, el efecto terapéutico de un bisfosfonato (clodronato) encapsulado en liposomas (lip-clod), el cual elimina macrófagos hepáticos y esplénicos del SRE. Se inocularon ratones i.v. con 0,2ml. de lip-clod o salina; luego de 24hs los animales recibieron una dosis de Ac. Los resultados obtenidos fueron, Ac:  $16 \pm 4$  vs. Ac+lip-clod:  $145 \pm 17$  ( $p < 0.001$ , n=6). Además, se evaluó la capacidad del lip-clod de revertir una trombocitopenia previamente establecida. Así, ratones tratados con Ac fueron inoculados 4hs más tarde con lip-clod. El recuento plaquetario fue: control:  $410 \pm 10$ ; Ac:  $39 \pm 2$ ; Ac+lip-clod:  $218 \pm 2$  (vs. control  $p < 0.001$ , n=6). El tiempo de sangría en ratones tratados con lip-clod con o sin Ac no difirió de los controles (<2 min.) mientras que Ac: >2min.(rango 4-6.5), indicando que la hemostasia está bien controlada en estos animales. Estos datos demuestran que este protocolo induce una rápida reposición en las plaquetas circulantes, siendo muy efectivo en el tratamiento de la PTI experimental.

##### 8. Inhibición del crecimiento de los megacariocitos por óxido nítrico.

Mirta Schattner, Alejandra Gorostizaga, Roberto Pozner, Ricardo Gomez, \*Carlos Fondevila, María Lazzari

*Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. \*Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Previamente demostramos que dadores de óxido nítrico (ON) inhiben la producción de megacariocitos (Mks) obtenidos a partir de células mononucleares de médula ósea humana. A fin de investigar si esta inhibición estaba asociada a un efecto directo sobre las células progenitoras o a la inducción de factores inhibitorios sobre las células accesorias, evaluamos el efecto del

DETA/ON en células CD34<sup>+</sup> obtenidas por inmunoselección magnética positiva. Los Mks fueron identificados por citometría de flujo luego de 12 días de cultivo. El DETA/ON disminuyó el número absoluto de Mks en cultivos de CD34<sup>+</sup> estimulados con TPO (10 ng/ml) ( $X \pm ES$ ,  $n=4$ ) ( $230 \pm 35, 197 \pm 25, 47 \pm 12, 7 \pm 5, 1 \pm 1 \times 10^3$  Mks a 0, 5, 60, 125 y 250  $\mu$ M de DETA/ON). La disminución de Mks estuvo asociada a una disminución del número total de células y al porcentaje de CD41<sup>+</sup>. Para excluir que la inhibición de los Mks fuera debido a la molécula transportadora, o al nitrito, se agregó dichas sustancias a los cultivos controles. No se observó inhibición en la formación de Mks a la concentración de DETA y nitrito utilizada (250  $\mu$ M) ( $n=3$ ). El tratamiento de las células CD34<sup>+</sup> con L-arginina 100, 50 y 10  $\mu$ M inhibió 60, 40 y 5% ( $n=3$ ) la proliferación de los Mks mientras que el cultivo de las células en presencia de 8-Br-cGMP (6 y 3  $\mu$ M) no tuvo efecto alguno ( $n=3$ ). Los resultados sugieren que el ON inhibe la proliferación de Mks a través de un efecto directo sobre células progenitoras y a través de mecanismo(s) no relacionado(s) con la guanilato ciclasa.

### 9. Uso de desmopresina en embarazadas con Enfermedad de von Willebrand. Analía Sánchez Luceros, Adriana Arizó, Patricia Casais, Adriana Woods, Susana Meschengieser, María Lazzari

*Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

**Introducción:** El uso de desmopresina (DDAVP) en el embarazo es controvertido, sin embargo su utilización ha permitido evitar el uso de hemoderivados en enfermedad de von Willebrand (vWD). Aunque en el embarazo se observa una normalización de los parámetros de vWD, estudios retrospectivos han señalado una mayor frecuencia de hemorragia postparto (15-29%). **Objetivos:** Evaluar los resultados del uso de DDAVP en embarazadas con vWD y sus recién nacidos. **Resultados:** 25 embarazadas en 23 mujeres (media de edad de 28,7 años, rango 17-40). Los diagnósticos fueron: vWDTipo1: 12, Tipo 2: 1, plaq: 4 y "probable": 5. Indicaciones: 1er Trimestre (T): 1 hematoma retroplacentario y amenaza de aborto; 2do T: 1 cerclaje; 3er T: (Total 25) 15 embarazos antes de realizar cesárea (2/15 de urgencia), 2 antes de anestesia peridural preparto vaginal y 8 partos vía vaginal con infusión de DDAVP luego de la ligadura del cordón umbilical. Dos pacientes tuvieron hemorragia postparto, una de ellas asociada a infusión inadecuada de la droga. La otra paciente recibió una segunda dosis de DDAVP a las 6 horas con buena respuesta. Un caso severo requirió además crioprecipitados. **Conclusiones:** se observó buena respuesta hemostática, sin toxicidad materna ni neonatal. En las formas severas puede disminuir el requerimiento de hemoderivados.

### 10. Efecto de la deficiencia de Zinc sobre parámetros hemáticos de rata. Nidia Gómez\*, Isabel Giménez\*\*, Silvina Alvarez\*, Silvia Varas \*, María Fernández\*, Sofía Giménez\*

\* Laboratorio de Química Biológica, Universidad Nacional de San Luis, \*\*Complejo Sanitario San Luis.

El Zinc es un oligoelemento esencial para el equilibrio metabólico y la disminución de su aporte en la ingesta diaria produce variadas alteraciones. El objetivo de este trabajo fue determinar las posibles alteraciones en los parámetros hematológicos en la rata con una deficiencia crónica de Zinc. Se utilizaron ratas Wistar machos de  $220 \pm 30$  g de peso inicial, que recibieron por 4 meses una dieta AIN-93G modificada por Reeves et al. Los animales se separaron en dos lotes: Grupo Control (Co) con un contenido de Zn de 30 mg/Kg de dieta y un lote con una dieta deficiente de Zinc (ZD). A los 4 meses se sacrificaron los animales colectando la sangre con EDTA al 5%. Se hizo el recuento de leucocitos, eritrocitos (RBC), reticulocitos y la determinación de Hb, Hto, MCHC, RDW, HCM y VCM, en un contador hematológico Cell-Dyn 1600, Abbott. Las protoporfirinas libres eritrocitarias (FEP) se midieron por el método de Piomelli en un fluorómetro Shimadzu. Los resultados se expresaron como término medio  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ). Los animales ZD presentaron leucopenia con linfopenia ( $p <$

$0,0001$  y  $0,05$ ) e incremento de granulocitos con neutrofilia ( $p < 0,01$  y  $0,05$ ). La serie roja presentó disminución de reticulocitos y HCM ( $p < 0,001$  y  $0,01$ ) con un aumento del RBC, Hb, Hto ( $p < 0,01$ ), sin cambios en el VCM. Las FEP bajaron en las ZD con un valor de  $Co 57 \pm 9$  y ZD  $39 \pm 4$  ( $p < 0,05$ ). La deficiencia crónica de Zinc produce en la rata cambios de los parámetros hemáticos, afectando tanto la serie blanca como la roja.

### 11. Niveles de TGF $\beta$ , bFGF Y PDGF en trombocitemia esencial durante la remisión hematológica de la enfermedad. Paola Lev, Rosana Marta, Carlos Pirola, Felisa Molinas

*Sección Hematología-Investigación. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

En un trabajo previo en pacientes con trombocitemia esencial (TE) encontramos aumento de los niveles plasmáticos de TGF $\beta$ , bFGF y PDGF en tanto que a nivel intraplaquetario el TGF $\beta$  se halló normal, el bFGF aumentado y el PDGF disminuido. En el presente estudio se determinaron los niveles proteicos de estos factores de crecimiento durante la remisión hematológica y de ARN mensajero del TGF $\beta$  antes y durante el tratamiento con angrelide. En 10 pacientes con TE se midieron los factores por técnica de ELISA, en plasma citratado y plaquetas lavadas y en 5 de ellos se midió el ARNm por la técnica RT-PCR semicuantitativa. Los niveles plasmáticos obtenidos en pacientes y normales, fueron (mediana y rango): TGF $\beta$ , 1376 pg/ml (960-2346) y 611 pg/ml (107-894),  $p < 0,001$ ; bFGF, 1,8 pg/ml (1-3.9) y  $< 1$  pg/ml,  $p < 0,01$ ; PDGF, 1671 pg/ml (674-2321) y 1699 pg/ml (432-3914). Los niveles intraplaquetarios fueron: TGF $\beta$ , 166 ng/ml (124.5-230) y 188.5 ng/ml (94.5-377); bFGF, 1 ng/ml (0.7-1.6) y 0.34 ng/ml (0.04-0.9),  $p < 0,01$ ; PDGF, 117.5 ng/ml (21-180.5) y 166 ng/ml (70-303.2). El nivel del ARNm del TGF $\beta$  se halló aumentado, con tendencia a la normalización durante el tratamiento. En conclusión, en pacientes con TE en remisión hematológica los niveles plasmáticos de TGF $\beta$  y de bFGF se mantienen elevados, mientras el PDGF se normaliza. El nivel intraplaquetario del TGF- $\beta$  permanece normal, el de bFGF continua elevado y el de PDGF se normaliza.

### 12. Receptor de interleuquina 6 soluble y anclado a membrana en células de sangre periférica en pacientes con trombocitemia esencial. Nora Goette, Rosana Marta, Felisa Molinas

*Sección Hematología Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

En estudios previos encontramos aumento del receptor soluble de interleuquina 6 (IL-6sR) plasmático en 50% de los pacientes con trombocitemia esencial (TE) y aumento de los niveles de expresión tanto del receptor anclado (IL-6R) como del IL-6sR en células mononucleares por RT-PCR. Continuando estos estudios evaluamos el IL-6R en la membrana de los glóbulos blancos (GB) en 5 pacientes y 3 normales por FACs utilizando IL-6 biotinilada que se une a avidina-fluoresceína. Las poblaciones de GB se identificaron usando anticuerpos monoclonales (CD45, CD3, CD19 y CD14) unidos a PE o PERCP. Además, se midió la liberación de IL-6sR en el sobrenadante del cultivo de 48 horas de células mononucleares de 14 pacientes (7 con IL-6sR plasmático normal y 7 aumentado) y 7 normales. La expresión del IL-6R por FACs en las diferentes poblaciones de GB no difirió entre pacientes y normales. En cambio, los niveles de IL-6sR liberado al medio de cultivo por las células mononucleares estuvieron aumentados en los pacientes independientemente del nivel plasmático, 0.221 fg/cél (0.12-0.625) (mediana y rango) con respecto a los normales, 0.105 fg/cél (0.072-0.143),  $p=0.0003$ . En conclusión, estos resultados sugieren que las células mononucleares son una fuente de la anormal producción del IL-6sR en pacientes con TE, pero este aumento de la liberación no se refleja en un cambio en la expresión del IL-6R en la membrana de las células de sangre periférica.

## NEUROCIENCIAS I

**13. Mecanismos intracelulares que participan en la supervivencia de las células granulares del cerebelo en cultivo.**  
Laura Borodinsky, Mónica Fiszman

*Laboratorio de Neurociencias, Centro de Investigaciones Médicas Albert Einstein- CIMA, Buenos Aires.*

La despolarización modula la proliferación y la supervivencia de células de la estirpe neural. En el caso de soluciones despolarizantes de KCl, el efecto es mediado por un aumento de calcio intracelular que podría activar distintas cascadas de quinasas que regulan el ciclo celular. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos que determinan que KCl 25 mM (25K) promueva la supervivencia neuronal en cultivos de células granulares del cerebelo. Se obtuvieron cultivos de células granulares del cerebelo a partir de ratas de 6 a 8 días de edad. Las células fueron sembradas usando un medio de cultivo libre de suero en multiplacas de 96. A los dos días *in vitro* se realizaron los tratamientos con 25K y con bloqueantes del flujo de calcio o de quinasas. A los 7 días de cultivo se midió la supervivencia celular. Los resultados muestran que el MgCl<sub>2</sub> 10 μM y nifedipina 1 μM bloquean completamente la supervivencia inducida por 25K. El tratamiento con un inhibidor de MEK1 (PD98059) provoca un bloqueo parcial de la supervivencia promovida por 25K. Por otro lado el agregado de PD98059 provoca una disminución de la supervivencia en cultivos controles (KCl 5 mM). El inhibidor de la CaMK II (KN93) produce un bloqueo completo de la supervivencia inducida por 25K sin afectar la supervivencia basal. Concluimos que la supervivencia promovida por KCl es mediada por un influjo de calcio a través de canales de calcio voltaje dependientes de tipo L. El incremento de la concentración intracelular de calcio provocaría la activación de la CaMK II que estimularía la supervivencia de las células granulares del cerebelo en cultivo.

**14. Aumento de la inmunoreactividad para c-fos y de la actividad de nicotinamida-adenina dinucleotidilfosfato diaforasa (NAD-PH-D) en el núcleo supraóptico (SON) de ratas tratadas con acetato de desoxicorticosterona (DOCA).** Flavia Saravia, Susana Gonzalez, Claudia González-Deniselle, Claudia Grillo, Paulina Roig, Alejandro De Nicola

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Instituto Universitario de Ciencias de la Salud, Fundación Barceló y Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

La activación de las neuronas magnocelulares hipotalámicas es un fenómeno complejo en cuya regulación participa el óxido nítrico (NO), involucrado en el control del stress osmótico y la regulación de vasopresina, oxitocina y angiotensina II. El tratamiento de las ratas con DOCA brinda un modelo de estadio prehipertensivo y de las alteraciones en el balance hidrosalino, donde los núcleos hipotalámicos cumplen un rol fundamental. El producto del gen inmediato temprano c-fos, implicado en la regulación de la expresión génica de neurotransmisores, también caracteriza esas alteraciones. Nos propusimos estudiar la inmunoreactividad para c-fos y la histoquímica de la NADPH-D, indicador de las neuronas productoras de NO en el SON en ratas que recibieron una única o 4 inyecciones (i) de DOCA (10 mg). El número de núcleos c-fos aumentó significativamente luego de 1 y 4 i de DOCA (Control (CT) li: <1 vs DOCA li: 16,43 ± 91 p<0.001; CT 4i: <1 vs DOCA 4i: 23.85 ± 2.25 p<0.001). El análisis cuantitativo de imágenes reveló que las neuronas NADPH-D positivas aumentaron en número luego de 4i de DOCA (CT li: 6.37 ± 85 vs DOCA li: 9.69 ± 1.15, ns; CT 4i: 5.12 ± 31 vs DOCA 4i: 15.97 ± 1.66 p<0.001 Anova y Bonferroni post-test) en tanto que no varió el área celular ni la intensidad de la marca. El NO en el SON en las ratas tratadas con DOCA se relacionaría con la activación magnocelular y conjuntamente con la proteína c-fos podrían modular la expresión de otros neuropéptidos vasoactivos.

**15. Caracterización de la apoptosis radioinducida en el Sistema Nervioso Central en desarrollo.** Pablo Gisone, Julieta Sanjurjo, Diana Dubner, Severino Michelin, María del R. Pérez, Marcos Barboza\*

*Autoridad Regulatoria Nuclear (\*) Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

La muerte apoptótica está particularmente asociada con radiación de Baja Transferencia Lineal de Energía (LET). En este estudio se caracterizó la apoptosis radioinducida en un cultivo de precursores neuronales obtenidos de ratas Wistar en los días 15, 17 y 19 de vida prenatal (pre) y 5 de vida postnatal (post) expuestos a radiación gamma y a un campo mixto neutrón-gamma (Alta LET). Las dosis estuvieron entre 0,2 y 2 Gy para fotones y 4 Gy para campo mixto. Se utilizaron métodos cualitativos: microscopía óptica, de fluorescencia y electroforesis en agarosa, y cuantitativos: Citometría de Flujo en células previamente fijadas y tratadas con Ioduro de Propidio. Paralelamente se ensayó viabilidad con técnica de MTT. Se verificó fragmentación de ADN en todas las dosis a partir de las 4 hs desde los 0,4 Gy. Para 15 días (pre) el valor del control fue de 7,3% (+ 1,1), para 0,2 Gy fue de 7,4% (+ 1,3), para 0,4 Gy 18,6% (+ 2,3) para 1 Gy 45,1% (+4,3) y 2 Gy 57,1% (+ 4,8). Para 17 días (pre) control 8,9% (+ 2,4), 2Gy 39,3% (+3,4); para 19 días (pre) control 3,9% (+ 0,11), 2 Gy 35,9% (+ 0,65); 5 días (post) control 11,2 % (+ 2,1) y 2 Gy 15,2% (+ 1,5). Con campo mixto a 20 hs control 9,62% (+ 1.5), 4 Gy 41,8% (+3.4). La apoptosis fue significativamente dosis dependiente y altamente relacionada con el grado de diferenciación celular. La LET no modificó la respuesta apoptótica pero sí la viabilidad celular, cuyos valores 20 hs post-irradiación con respecto a los controles fueron: 80.55% (+ 0.02) para fotones y 54.9% (+ 0.05) para campo mixto.

**16. Un modelo animal de frustración: Contraste negativo sucesivo.** Santiago Pellegrini, Mariana Bentosela, Rafael Forestieri, Alba Mustaca

*Facultad de Psicología, UBA; Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Con frecuencia tenemos experiencias donde nuestras acciones no son recompensadas como esperamos. Estos fenómenos se denominan efectos de *frustración*. Uno de los procedimientos es el contraste negativo sucesivo consumidor. Sujetos condicionados con sacarosa al 32% (recompensa alta) consumen menos cuando se cambia a sacarosa al 4% comparados con controles que siempre recibieron 4%. El efecto desaparece con drogas tranquilizantes y lesiones en la amígdala (Flaherty, 1996), está asociado a cambios inmunológicos (Mustaca y col, 1995), en la conducta social (Mustaca y Martínez, 1998) y otras respuestas. Presentamos dos experimentos con ratas donde se encuentran los mismos resultados utilizando alimento sólido, y cuatro con ratones Balb-C saciados, entrenados en sus jaulas, en diseños de economía cerrada y sacarosa. Las variables dependientes fueron: consumo (en ml), ambulación y "rearing". Los animales frustrados consumieron menos y aumentaron la ambulación y el rearing. Con ratones el efecto desaparece con 4 mg/kg de diazepam administrados 20 min. antes de la frustración. Este modelo permite estudiar mecanismos y efectos de un evento estresante que no implica dolor físico.

**17. Inhibición presináptica de la adenosina sobre la liberación espontánea de acetilcolina en sinapsis neuromuscular de mamífero.** Adriana Losavio, Silvana De Lorenzo, Salomón Muchnik.

*Laboratorio de Neurofisiología. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.*

La secreción de acetilcolina (ACh) en sinapsis neuromusculares puede ser modulada por sustancias que son liberadas

junto al neurotransmisor o que provienen de la degradación de aquéllas. La adenosina (AD) reduce la liberación espontánea de ACh, al unirse a sus receptores A1 ubicados en las terminales nerviosas motoras ( $35.8 \pm 8.1$ ,  $n=4$ ). Sin embargo, el mecanismo por el cual ejerce este efecto no está claro: la AD podría disminuir la entrada de  $Ca^{2+}$  por los canales de  $Ca^{2+}$ -voltaje-dependiente (CCVD) o podría reducir la probabilidad de liberación actuando sobre algún punto del aparato secretor. En preparaciones frénico-diafragma de ratas se investigó el efecto de  $100 \mu M$  AD sobre la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPPs), en condiciones no relacionadas al influjo de  $Ca^{2+}$  por los CCVD: A) en  $0Ca^{2+}$ -BAPTA  $1mM$  +  $Cd^{2+}100 \mu M$  (bloqueante universal de los CCVD, utilizado para evitar el flujo de  $Ca^{2+}$  al invertir su gradiente) y B) sobre la respuesta osmótica. En A se observó una disminución ( $\downarrow$ ) de la fMEPPs del  $71.4 \pm 11.9\%$  ( $n=4$ ) con respecto a los valores en Ringer normal y el agregado posterior de AD indujo una  $\downarrow$  de fMEPPs del  $28.1 \pm 13.5\%$  con respecto a la solución A. En B la AD redujo el área de la respuesta osmótica (AD/control:  $0.59 \pm 0.04$ ,  $n=3$ ). Estos resultados sugieren que la AD produce una inhibición presináptica de la liberación espontánea de ACh actuando sobre algún sitio del aparato secretor en un paso posterior a la entrada de  $Ca^{2+}$  por los CCVD.

**18. Receptor GABA<sub>A</sub> y óxido nítrico sintasa: efectos de la hipoxia aguda prenatal.** Diego Rodríguez Gil<sup>1</sup>, Alejandro Lomniczi<sup>2</sup>, Valeria Rettori<sup>2</sup>, Sara Fiszler de Plazas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, UBA. <sup>2</sup>Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET), Buenos Aires

Estudios recientes sugieren la participación de la NO sintasa (NOS), en la modulación negativa del complejo receptor GABA<sub>A</sub>. El objetivo del presente trabajo fue tratar de establecer una correlación temporal entre los sitios receptores GABA<sub>A</sub> y la actividad de la NOS, en condiciones normales y de hipoxia experimental. Se utilizaron embriones de pollo en diferentes estadios de desarrollo (ED), los cuales fueron sometidos a una hipoxia hipóxica aguda normobárica ( $O_2$  al 8%, por 60 min). Los ensayos de unión de [<sup>3</sup>H]GABA se realizaron en una fracción de membranas sinápticas aisladas de lóbulos ópticos, mientras que la determinación de la actividad de NOS se llevó a cabo midiendo la formación de citrulina marcada a partir de [<sup>14</sup>C]arginina. Los resultados obtenidos muestran una aparición temprana de la NOS y que el tratamiento hipóxico produce una disminución significativa tanto de la unión de [<sup>3</sup>H]GABA, con un perfil edad dependiente (inhibición de un 20-25% en los ED 12, 14, 16 y de 11% en ED17) como de la actividad de la NOS (mayor a un 25% hasta el ED17). En ambos casos no se observaron diferencias significativas en el ED18, indicando que los estadios tempranos de desarrollo son más sensibles al tratamiento hipóxico. Estos datos sugieren que la NOS no participaría en la regulación negativa del receptor en el modelo de hipoxia prenatal estudiado, ya que la disminución de la unión de [<sup>3</sup>H]GABA se correlaciona con un descenso en la actividad de la NOS.

## GASTROENTEROLOGIA I

**19. Expresión de la proteína transportadora de aniones orgánicos mrp2 en intestino delgado de rata.** Aldo Mottino, Timothy Hoffman, Lothar Jennes, Mary Vore

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Departamento de Farmacología, Escuela de Medicina, Universidad de Kentucky, EEUU.

El intestino delgado representa un órgano alternativo del hígado en las reacciones de fase II o de conjugación. La bomba exportadora de aniones orgánicos conjugados con ácido glucurónico, glutatión, sulfato, etc., conocida como mrp2 o cMOAT, miembro del «ATP Binding Cassette», fue descrita primariamente en la membrana canalicular del hepatocito. En este trabajo se estudió su expresión en intestino delgado de rata. Se analizó el contenido

de mrp2 por «westernblot» en homogenado y en preparación de membrana apical (MA) de enterocito. Desde el píloro a la válvula ileocecal se aislaron 9 segmentos de igual longitud que se estudiaron separadamente. La distribución a lo largo de la vellosidad también fue analizada aislando 3 poblaciones celulares por raspado diferencial (regiones alta y baja de la vellosidad y cripta). La localización «in situ» de mrp2 fue evaluada por inmunohistoquímica. Se analizó además el contenido del ARNm correspondiente por «northernblot» en las mismas preparaciones. Del análisis conjunto del contenido de mrp2 por «westernblot» y por inmunohistoquímica se desprende que la proteína se localiza principalmente en MA sugiriendo un rol secretor hacia la luz intestinal. A su vez, la expresión fue mayor en duodeno y yeyuno que en íleon y en la parte superior de la vellosidad que en la cripta. El contenido relativo de ARNm fue similar en los distintos segmentos intestinales, detectándose en mayor proporción en la parte superior de la vellosidad. Puesto que la proteína mrp2 presenta un patrón de distribución similar a las enzimas de fase II, se concluye que ambos sistemas podrían actuar coordinadamente en la metabolización-secreción de compuestos potencialmente tóxicos al organismo.

**20. Evidencias de transporte transepitelial de agua en recto mediado por aquaporinas.** Arlinet Kierbel, Fabiana García, Claudia Capurro, Mario Parisi, Raúl Marinelli

Instituto de Fisiología Experimental-CONICET, Universidad Nacional de Rosario y Laboratorio de Biomembranas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

En estudios previos demostramos que el epitelio rectal de rata expresa el canal de agua aquaporina 3 (AQP3) en la membrana basolateral. Esto sugiere que las AQPs pueden cumplir un rol importante en el transporte de agua en dicho epitelio. Se estudió entonces el transporte transepitelial de agua en recto de rata montado en cámara de Ussing y la expresión de otros miembros de la familia de las AQPs. El flujo de agua (J<sub>w</sub>) absorbido inducido por un aumento de la osmolaridad serosa, resultó disminuido en presencia del inhibidor de AQPs HgCl<sub>2</sub> ( $\Delta J_w$ ,  $\mu l/min.cm^2$ ,  $0.40 \pm 0.06$  vs  $0.18 \pm 0.01$   $p < 0.02$ ). El flujo de [<sup>14</sup>C]manitol, marcador de la vía paracelular, no se modificó con el incremento osmótico, descartando una contribución importante de dicha vía. Ensayos de PCR utilizando primers específicos para cada una de las aquaporinas de mamífero conocidas (AQP1-9) demostraron la presencia del ARNm de la AQP8 en mucosa rectal. Se demostró por inmunoblotting la presencia de una banda de aproximadamente 34 kDa correspondiente a la AQP8 exclusivamente en la fracción subcelular enriquecida en membranas plasmáticas. Posterior aislamiento de «brush borders», demostró la presencia de la AQP8 en membrana apical. Conclusión: Nuestros resultados sugieren que el transporte de agua en epitelio rectal es principalmente transcelular, mediado por AQP8 en la membrana apical y por AQP3 en la membrana basolateral.

**21. Los colangiocitos expresan el canal de agua aquaporina-4 (AQP4) en membrana basolateral.** Raúl Marinelli, Lihn Pham, Pamela Tietz, Nicholas LaRusso

Instituto de Fisiología Experimental-CONICET, Universidad Nacional de Rosario, Center for Basic Research in Digestive Diseases, Mayo Clinic, USA.

La secretina induce la inserción exocítica de aquaporina-1 (AQP1) en membrana apical del colangiocito, un mecanismo clave en la secreción de bilis ductular (Marinelli et al. AJP 276:G280 '99). AQP1 también se encuentra en dominio basolateral pero en bajos niveles, sugiriendo que otra aquaporina facilitaría el transporte basolateral de agua. En este trabajo se estudió en colangiocitos de rata la expresión, localización subcelular y posible regulación por secretina de AQP4, aquaporina basolateral en diversos epitelios transportadores. AQP4 (ARNm) se investigó por transcripción reversa y PCR (RT-PCR) utilizando primers específicos. AQP4 (proteína) se investigó por inmunoblotting en membranas plasmáticas apical y basolateral e intracelulares preparadas de colangiocitos incubados con secretina ( $0-10^{-7}$  M). Por RT-PCR se

amplificó un producto de 311 pares de bases, 100% homólogo a la secuencia publicada de AQP4. Por inmunoblotting se detectó una banda de 31 kDa correspondiente a AQP4 exclusivamente en dominio basolateral. Secretina no alteró el contenido de membrana de AQP4, pero aumentó AQP1 (+200%  $p < 0.05$ ,  $n:3$ ). **Conclusión:** (1) los colangiocitos expresan AQP4 (ARNm y proteína), (2) a diferencia de AQP1, que es predominantemente apical y modulada por secretina, AQP4 está constitutivamente localizada en dominio basolateral. Esto sugiere que durante la formación de bilis estimulada por secretina, AQP1 facilita principalmente la secreción apical de agua, mientras que AQP4 su recuperación basolateral.

**22. Control hormonal de la biogénesis de la polaridad hepatocelular en duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR): I. Estudios funcionales.** Marcelo Roma, Piotr Milkiewicz, Roger Coleman

*Instituto de Fisiología Experimental (IFISE), CONICET-Universidad Nacional de Rosario y Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Birmingham, Inglaterra.*

Se analizó el control hormonal de la restauración de la polaridad secretora luego del aislamiento y cultivo de DAHR, determinándose el % de DAHR que acumularon en su vacuola canalicular colil-lisil-fluoresceína (CLF). Recién aisladas, las DAHR fueron incapaces de acumular CLF, aumentando su número con el tiempo y alcanzando un máximo a las 4-5 h de cultivo. Dibutiril-AMPc (dib-AMPc, 50  $\mu$ M), el elevador de  $Ca^{2+}$  taspigarguina (TAP, 5 nM) y el inhibidor de proteína quinasa C (PKC) estaurosporina (EST, 1  $\mu$ M) aumentaron, mientras que el quelante de  $Ca^{2+}$  BAPTA (20  $\mu$ M) y el activador de proteína quinasa C (PKC) forbol dibutirato (FDB, 1  $\mu$ M) redujeron, el % de DAHR que acumularon CLF a 3 h de cultivo (C:  $44 \pm 4$ , dib-AMPc:  $61 \pm 4^*$ , TAP:  $53 \pm 3^*$ , EST:  $59 \pm 2^*$ , BAPTA:  $13 \pm 4^*$ , FDB:  $29 \pm 3^*$ ;  $*p < 0.05$  vs. C). El inhibidor de PKA KT5720 (1  $\mu$ M) no tuvo efecto *per se*, ni inhibió el estímulo de dib-AMPc. En estadios iniciales, se observaron vesículas intracelulares conteniendo CLF; éstas decrecieron con el tiempo, sugiriendo inserción de transportadores al polo apical. Dib-AMPc y TAP aumentaron, mientras que BAPTA y FDB redujeron, el % de DAHR exhibiendo estas vesículas a 1 h de cultivo (C:  $13 \pm 2$ , dib-AMPc:  $23 \pm 5^*$ , TAP:  $24 \pm 4^*$ , EST:  $29 \pm 3^*$ , BAPTA:  $2 \pm 1^*$ , FDB:  $8 \pm 1^*$ ;  $*p < 0.05$  vs. C). Los resultados indican que la restauración de la polaridad funcional es estimulada por AMPc vía elevación del  $Ca^{2+}$ , y que la activación de PKC inhibió este proceso. Dado que ciertas PKCs son activadas por  $Ca^{2+}$ , PKC podría tener un rol regulador negativo en la activación mediada por  $Ca^{2+}$  de la biogénesis de la polaridad hepatocelular

**23. Control hormonal de la biogénesis de la polaridad hepatocelular en duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR): II. Aspectos morfológicos.** Marcelo Roma, Piotr Milkiewicz, Roger Coleman

*Instituto de Fisiología Experimental (IFISE), CONICET-Universidad Nacional de Rosario y Departamento de Ciencias Biológicas, Univ. de Birmingham, Inglaterra.*

Demostramos que el AMPc, posiblemente vía elevación del  $Ca^{2+}$  citosólico, acelera la restauración de la polaridad funcional en DAHR post-aislamiento y que la activación de proteína quinasa C (PKC) inhibe este proceso. Dado que la reorganización del polo secretor de las DAHR es dependiente de microfilamentos, se analizó si, en los cambios inducidos por moduladores hormonales, existe una correlación temporal entre la relocalización pericanalicular de F-actina y la inserción apical del transportador mrp2, visualizados por marcado fluorescente seguido de microscopía confocal. A 1 h de su aislamiento, las DAHR presentaron una distribución homogénea de F-actina y mrp2 en el cuerpo celular, alcanzando una distribución predominantemente (peri)-canalicular luego de 4.5 h de cultivo. Esta distribución normal fue alcanzada en solo 2 h luego de la administración de dibutiril-AMPc (50  $\mu$ M) y taspigarguina (5 nM), un elevador de  $Ca^{2+}$ . En cambio, BAPTA/AM (20  $\mu$ M), un quelante intracelular de  $Ca^{2+}$ , y forbol dibutirato

(1  $\mu$ M), un activador de PKC, inhibieron esta reorganización, de modo que, a 4.5 h de cultivo, una significativa cantidad de F-actina y mrp2 fue visualizada en el cuerpo celular. Los resultados muestran que existe una buena correlación temporal entre la reorganización de actina y la inserción de transportadores apicales. Así, la estimulación de la inserción de transportadores canaliculares inducida por AMPc y  $Ca^{2+}$ , así como su inhibición por PKC, podría estar mediado por un efecto modulador primario a nivel de la organización de microfilamentos.

## ENDOCRINOLOGIA I

**24. Detección de síndrome de Cushing preclínico en pacientes con sobrepeso y diabetes mellitus tipo 2.** Liliana Contreras, Estela Cardoso, María Pia Lozano, Josefina Pozzo, Patricia Pagano, Haroldo Claus Herberg

*Departamento de Endocrinología, Instituto de Investigaciones Médicas A.Lanari, Universidad de Buenos Aires y Servicio de Endocrinología, Hospital Alemán, Buenos Aires.*

El Síndrome de Cushing preclínico (SCP) es un estadio previo al síndrome de Cushing manifiesto (SC). El objetivo de este estudio fue detectar SCP en 48 diabéticos tipo 2 ambulatorios con sobrepeso (DM) y BMI  $\geq 25,5$  kg/m<sup>2</sup>, HbA<sub>1c</sub>  $\geq 5.7\%$ , tratados con hipoglucemiantes orales y/o insulina. Los controles fueron 40 obesos normoglucémicos (Ob) y 36 sujetos sanos normopesos (N). Se determinó cortisol urinario vespertino (Cuv; ng/mg cr) y la excreción diaria de cortisol (CLU;  $\mu$ g/24 hs). El cortisol sérico 8 hs (F;  $\mu$ g/dl), post supresión nocturna con 1 mg de dexametasona oral (DEX), se midió en 48 DM, 18 Ob y 15 N. Los cortisoles se detectaron por RIA. Los resultados se expresan en mediana y rango (estadística: tests Kruskal-Wallis y Mann Whitney). En DM (47/48) el CLU fue similar al de Ob y N (38,0; 14-112; 51,2; 30-87; 44,0; 26-91, respectivamente). En 47/48 DM el Cuv (14,0; 0,1-44,0) fue diferente a Ob (4,5; 0,1-37,5) y N (5,5; 0,1-44,0);  $p:0,0001$  y  $p:0,03$ , respectivamente. El F post Dex en DM (47/48) fue superior (1,2; 0,4-1,8) a Ob (0,1; 0,1-2,6) y N (1,0; 0,7-1,4);  $p:0,001$  y  $p:0,019$ , respectivamente. En una mujer DM se detectó CLU: 148,0; Cuv: 481,0 y F post Dex:19,0; diagnosticándose SCP. Conclusiones: la dinámica de cortisol en 47 DM fue diferente a Ob y N, sin evidencia de SCP. En un caso se confirmó SC, comprobándose remisión del hipercorticismos y normalización de la glucemia post hipofisectomía. Estos resultados sugieren la utilidad de la detección precoz de hipercorticismos en DM.

**25. Participación de proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) en el mecanismo de acción hormonal en células de Leydig de tumor de ratón, MA-10.** Fabiana Cornejo Maciel, Cristina Paz, Ernesto Podestá

*Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Previamente demostramos la inhibición de la esteroidogénesis inducida por hCG en células intersticiales de testículo de rata por acción de inhibidores de PTPs. Estos resultados sugieren la participación de PTPs en el mecanismo de acción de hCG sobre la esteroidogénesis. Es por ello que en el presente trabajo se estudió el efecto de la hormona sobre la actividad de estas enzimas y sobre la defosforilación de sustratos endógenos usando una línea tumoral de células de Leydig bien caracterizada (MA-10). El análisis por Western blot y densitometría de las proteínas endógenas fosforiladas en tirosina revela la defosforilación dependiente de hCG (20 ng/ml) de proteínas de aproximadamente 120, 66 y 50 kDa (80, 25 y 30% de disminución con respecto al control). Este efecto es bloqueado cuando la estimulación se realiza en presencia de 1  $\mu$ M del inhibidor de PTPs óxido de fenilarsina (PAO), el cual inhibe la esteroidogénesis tanto en MA-10 como en células intersticiales. El monitoreo de la actividad de PTPs se realizó utilizando un ensayo en SDS-PAGE en presencia de <sup>32</sup>P]-poli-glutámico-tirosina, donde por autorradiografía se visualiza cualitativamente la remoción del sustrato como bandas claras

sobre un fondo oscuro. Los resultados muestran la presencia de varias PTPs en MA-10, dos de las cuales (110 y 50 kDa) son reguladas por acción de hCG, también reguladas por ACTH en zona fasciculata de adrenal de rata. Estos resultados sugieren que la acción de hCG en células MA-10 involucra la activación de PTPs con la consiguiente defosforilación de sustratos endógenos intermediarios en la regulación hormonal de la esteroidogénesis. Dado que hemos descrito este fenómeno también en la acción de ACTH en zona fasciculata de adrenal de rata, sugerimos que es un mecanismo universal en la regulación de la esteroidogénesis.

**26. Incremento de la actividad de una proteína tirosina fosfatasa (PTP) de 110 kDa, activable por acción de ACTH, por fosforilación *in vitro* con PKA.** Cristina Paz, Fabiana Cornejo Maciel, Cecilia Poderoso, Ernesto Podestá

*Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Hemos demostrado previamente que, en zona fasciculata (ZF) de corteza adrenal de rata, ACTH incrementa en forma rápida y transiente la actividad de PTPs solubles, mediante eventos dependientes de la activación de la PKA. Este efecto sobre la actividad de PTPs fue parcialmente atribuido a la activación de una PTP de 110 kDa. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la modulación de la actividad de la enzima proveniente de ZF de adrenal de rata por procesos de fosfo-defosforilación. La metodología utilizada para evaluar la actividad enzimática consistió en analizar las muestras por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS polimerizados en presencia de  $^{32}\text{P}$ -poli-glutámico-tirosina. La PTP de 110 kDa de citosol de ZF de adrenal de rata activada *in vivo* por ACTH fue defosforilada *in vitro* con fosfatasa ácida de papa (PAP), tratamiento que reduce su actividad al nivel detectado en el citosol control. El efecto de PAP fue revertido por incubación posterior con la subunidad catalítica de la PKA, en presencia de  $5 \times 10^{-4}$  M de ATP. La recuperación de la actividad es bloqueada cuando la fosforilación se realiza en presencia de 5  $\mu\text{M}$  de H89, un inhibidor de PKA. El análisis de SDS-PAGE y autorradiografía de muestras sometidas a estos tratamientos, realizados en paralelo y en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , revela la incorporación de  $^{32}\text{P}$  en la banda de 110 kDa sólo en ausencia de H89. Estos resultados sugieren que la activación de la PTP de 110 kDa por acción de ACTH involucra la fosforilación de la misma por mecanismos dependientes de PKA.

**27. Regulación por ACTH de la actividad de óxido nítrico sintetasa de zona fasciculata de glándula adrenal.** Cecilia Colonna, Cora Cymeryng, Sebastián Lotito, Laura Dada, Ernesto Podestá

*Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos descrito la participación de una actividad endógena de óxido nítrico sintetasa (NOS) en la modulación de la esteroidogénesis en zona fasciculata (ZF) de glándula adrenal de rata. Asimismo, hemos demostrado la presencia de las isoformas neuronal y endotelial de la enzima en este tejido. Por otra parte, se ha demostrado que ACTH aumenta la actividad de fosfatasa de tirosina en ZF adrenal. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la regulación por ACTH de la actividad enzimática de NOS. En este sentido, se determinó la actividad en las fracciones citosólica y microsomal obtenidas luego de la incubación de cuartos de adrenal con ACTH. Los resultados indicaron que en presencia de ACTH la actividad de NOS en citosol se incrementó significativamente (Control:  $1,25 \pm 0,1$  pmol/min/mg vs ACTH  $2,19 \pm 0,14$  pmol/min/mg) siendo este estímulo bloqueado por un inhibidor de fosfatasa de tirosina, el pervanadato (PV) (PV:  $1,12 \pm 0,2$  pmol/min/mg vs ACTH + PV:  $1,15 \pm 0,06$  pmol/min/mg). La actividad en microsomas, en cambio, se inhibió en presencia de ACTH, independientemente de la ausencia o presencia del inhibidor (Control:  $0,411 \pm 0,05$  pmol/

min/mg vs ACTH:  $0,247 \pm 0,03$  pmol/min/mg y PV:  $0,382 \pm 0,05$  pmol/min/mg vs ACTH + PV:  $0,15 \pm 0,03$  pmol/min/mg). En un análisis por western blot con un anticuerpo específico anti-fosfotirosina se observaron señales positivas en las zonas de peso molecular correspondientes a las dos isoformas de NOS. Los resultados indican que ACTH podría regular la actividad de NOS por un mecanismo que involucra la activación de fosfatasa de tirosina y/o su traslocación subcelular.

**28. Caracterización de una familia de acil-CoA tioesterasas involucrada en la esteroidogénesis como sustrato de la proteína quinasa AMPc dependiente.** Paula Maloberti, Cristina Paz, Fabiana Cornejo Maciel, Isabel Neuman, Ernesto Podestá.

*Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

En nuestro laboratorio hemos purificado y caracterizado una proteína (ARTIST) miembro de una nueva familia de fosfoproteínas con actividad de acil-CoA tioesterasa, intermediaria en la estimulación hormonal de la esteroidogénesis, a través de la liberación de ácido araquidónico. Estos tejidos se hallan bajo control de hormonas que utilizan la proteína quinasa AMPc dependiente (PKA) como intermediaria. La secuencia primaria de estas enzimas presentan sitios consenso de fosforilación para diferentes quinasas, entre ellas PKA. El objetivo del presente trabajo fue determinar si estas tioesterasas son sustratos de la PKA. La incubación de la proteína parcialmente purificada de citosol de adrenal con PKA indicó que ARTIST es fosforilada, como se observó por SDS-PAGE y autorradiografía. Estos resultados fueron avalados con la proteína recombinante. Para ello se subclonó el cDNA en el vector de expresión pGEX con el fin de obtener la proteína fusionada a la glutatión S-transferasa. La tioesterasa recombinante obtenida de las bacterias transformadas fue purificada a través de una columna de afinidad unida a glutatión y eluida con trombina. Esta proteína fue reconocida por anticuerpos antipeptido en un ensayo de Western blot. La fosforilación *in vitro* en presencia de la subunidad catalítica de la PKA demostró por SDS-PAGE y autorradiografía que la tioesterasa purificada es sustrato de esta quinasa. Se concluye que la acil-CoA tioesterasa estudiada, además de tener sitios consenso para PKA, se fosforila por acción de la misma.

**29. Liberación de ácido araquidónico a partir de araquidonoil-CoA por una nueva familia de tioesterasas intermediarias en la esteroidogénesis.** Pablo Mele, Paula Maloberti, Isabel Neuman, Ernesto Podestá.

*Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Previamente hemos demostrado la presencia de una fosfoproteína intermediaria en la liberación de ácido araquidónico en adrenal perteneciente a una nueva familia de tioesterasas que utilizan como sustrato acil-CoA, la misma fue denominada ARTIST (Arachidonic acid Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis) proponiendo que la misma libera ácido araquidónico dado que anticuerpos dirigidos contra el motivo serina lipasa inhibían la actividad esteroidogénica de esta enzima. En el presente trabajo se estudió si ARTIST puede liberar ácido araquidónico utilizando como sustrato araquidonoil-CoA. Para ello, se clonó, expresó en bacterias y purificó esta enzima determinándose su capacidad de hidrolizar 1- $^{14}\text{C}$ -araquidonoil-CoA. Los resultados muestran que la enzima libera ácido araquidónico a partir de este sustrato y presenta un  $K_m$  de 2,15  $\mu\text{M}$ . Esta enzima también se presenta en hígado y fue inducida por el ayuno o por proliferadores de peroxisomas (ácido bis(2-etilhexil éster) ftálico). Utilizando como fuente de enzima la inducida en hígado también se pudo demostrar que la misma es capaz de liberar ácido araquidónico de araquidonoil-CoA. Estos resultados apoyan el rol de estas fosfoproteínas en la regulación de la síntesis de esteroides a través de la liberación de ácido araquidónico.

## TUMORES I

**30. Inducción de senescencia y apoptosis en un carcinoma mamario murino expuesto a tratamiento crónico con 3'-azido-2',3'-didesoxitimidina (AZT).** Agueda Tejera, Daniel Alonso, Daniel Gomez, Ofelia Olivero.

*Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes; Laboratory of Cellular Carcinogenesis and Tumor Promotion, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA.*

Con anterioridad demostramos que la AZT se incorpora preferencialmente al DNA telomérico y provoca un acortamiento irreversible de los telómeros en células tumorales humanas en cultivo. En el presente trabajo, se estudiaron los efectos del tratamiento crónico con AZT (800  $\mu$ M) sobre la línea celular F3II de carcinoma mamario murino. Se determinó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, un marcador bioquímico asociado a senescencia. La inducción de apoptosis se examinó valorando la actividad de caspasa 3. Los cultivos expuestos a AZT durante más de 35 pasajes *in vitro* mostraron signos morfológicos de senescencia, actividad de  $\beta$ -galactosidasa y un aumento en la actividad de caspasa 3. *In vivo*, hembras Balb/c recibieron  $5 \times 10^4$  ó  $2 \times 10^5$  células F3II en el espacio subcutáneo del flanco. En los animales inoculados con la menor carga tumoral, la toma resultó menor para aquellos que recibieron las células expuestas al tratamiento crónico *in vitro* con AZT (Control: 100% vs. AZT: 20%,  $p < 0.05$ ). En los lotes que recibieron la mayor carga, si bien la toma tumoral no se vio afectada, la cinética de crecimiento fue menor (Control:  $227 \pm 57$  vs. AZT:  $38 \pm 12$  mm<sup>3</sup>/día,  $p < 0.05$ ). Los resultados muestran que el tratamiento crónico *in vitro* con AZT induce senescencia y apoptosis en cultivos celulares de carcinoma mamario murino y este efecto estaría asociado a un menor desarrollo tumoral al inocular las células *in vivo*.

**31. Expresión de p27, p21 y p53 en un carcinoma mamario murino resistente a antiprogéstágenos, que regresiona con estrógenos.** Sivia Vanzulli, Alejo Efeyan, Claudia Lanari; Alfredo Molinolo

*Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina; Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.*

La línea transplantable 59-2-HI, de un carcinoma mamario murino (Balb/c) inducido por medroxiprogesterona, es de crecimiento autónomo, y regresiona con estradiol ( $E_2$ ) o con los antiprogéstágenos ZK-98299 y mifepristona. La regresión se asocia a citostasis, incremento de apoptosis y expresión aumentada de las proteínas p21 y p27. Investigamos la regresión de la línea Bet, de origen similar, sensible sólo al tratamiento con  $E_2$ . Hembras Balb/c, con tumores de 25 a 50 mm<sup>2</sup> recibieron  $E_2$  (pellet de 5mg) o no se trataron. Los tumores se resecaron diariamente entre las 24 y 96 hs. para evaluar mitosis y apoptosis por morfología (índices en 10 campos de 100x) y p21 y p27 por inmunohistoquímica (IMH). El tratamiento disminuyó el índice mitótico (IM) y aumentó el índice apoptótico (IA) (Controles:  $IM = 1.72 \pm 0.27$ ,  $IA = 0.7355 \pm 0.57$ ; 24 hs. de  $E_2$ :  $IM = 0.07 \pm 0.22$ ,  $IA = 4.623 \pm 1.462$ ). La expresión de p27 se incrementó con el tratamiento y la de p21 mostró valores similares a los controles (Controles:  $p21 = 1,815 \pm 1,07$ ,  $p27 = 3.68 \pm 0,688$ ;  $E_2$  24 hs.:  $p27 = 18.086 \pm 3.81$ ,  $p21 = 2,513 \pm 0.98$ ). Estudios de IMH preliminares mostraron aumento de expresión de proteína p53. Esto es un signo indirecto de mutación; la p53 salvaje es no detectable por esta técnica. En este tumor la regresión se asocia al aumento de p27. Los bajos niveles de p21, posiblemente debidos a mutación de p53, podrían vincularse con insensibilidad a los antiprogéstágenos.

**32. Receptores de progesterona alterados en adenocarcinomas mamaros murinos resistentes a la terapia hormonal.** Luisa Helguero, Caroline Lamb, Alfredo Molinolo, Claudia Lanari

*Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires*

Hemos desarrollado líneas tumorales de carcinomas mamaros murinos progéstágeno-dependientes (PD) con sus variantes de crecimiento independiente (PI) respondedoras a tratamiento con antiprogéstágenos (PI-R) o resistentes (PI-NR) demostrando una correlación entre respuesta hormonal y expresión de isoformas de receptor de progesterona (RP). El objetivo fue a) corroborar por *western blots* con otros 3 anticuerpos monoclonales (AcMos) diferentes la identidad de isoformas de RP, b) correlacionar estos resultados con el número de RP totales por precipitación con carbón-dextrano y c) evaluar la funcionalidad de RP en tumores PI-NR. Con los AcMos Ab7, Ab5 y Ab4 se confirmó la expresión de isoforma B (115kDa), A (83 kDa) y PR78 kDa en los tumores PD y PI-R, y una de 80 kDa en los PI-NR. Solo con el Ab6 que reconoce la isoforma B, se observó una expresión muy intensa en las líneas tumorales PI-NR y moderada en las restantes. En las 3 líneas PI-R los RP están mayormente en citosol ( $p < 0.05$ ) (200-2000 fmoles/mg prot;  $n = 10$ ; 7 y 5) mientras que en las 3 PI-NR están mayormente en el núcleo ( $p < 0.05$ ) (20-600 fmoles/mg prot;  $n = 7$ ; 6 y 4). Oligonucleótidos antisentido (2.5-20  $\mu$ g/ml) de la isoforma B inhiben ( $p < 0.05$ ) la incorporación de ( $H^3$ )-timidina en cultivos primarios de un tumor PI-NR y paralelamente con la técnica de unión al ligando en células enteras, se demostró una disminución de RP total en cultivos tratados vs. no tratados ( $p < 0.01$ ). Se concluye que las líneas PI-NR expresan un RP alterado, constitutivamente activado importante en la proliferación celular.

**33. Mecanismos Inductores y Reguladores de la Resistencia a Multidrogas (MDR) en Células Tumorales.** Eloisi Caldas Lopes, Elida Alvarez, \* Mariano Scolnik, Silvia Hajos

*Cátedra de Inmunología, IDEHU-UBA-CONICET. \* Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

Agentes inmunosupresores como la Ciclosporina-A (CsA) y sus análogos (PSC833) pueden actuar como inductores de la apoptosis y como moduladores de la Resistencia a Multidrogas (MDR). Este trabajo se realizó con el objeto de inducir la expresión y selección de células MDR<sup>+</sup> a partir de células de una leucemia murina (LB), a través de subsecuentes pasajes *in vitro* por tratamiento con dosis crecientes de Doxorubicina o Vincristina y para estudiar los mecanismos involucrados en esa resistencia. Por ensayos de proliferación celular con timidina tritiada se observó que tanto las células LB resistentes a Doxorubicina (LBR-D) como las resistentes a Vincristina (LBR-V) presentaron un aumento significativo de la  $DL_{50}$  para ambas drogas en relación a las células LB no resistentes cultivadas en las mismas condiciones en ausencia de drogas (LBR) que corresponden:  $DL_{50}$  Doxo (LBR-D) = 700ng/ml,  $DL_{50}$  Vinc (LBR-V) = 500ng/ml y  $DL_{50}$  Doxo o Vinc (LBR) = 30ng/ml. Por citometría de flujo no se observó expresión de la Pgp-170, tampoco su funcionalidad en el eflujo de drogas, así como no se observó reversión diferencial de las células MDR<sup>+</sup> en relación a las MDR<sup>-</sup> cuando fueran tratadas con moduladores específicos de la Pgp-170 (CsA y PSC833). Si se observó un marcado sinergismo en la disminución de la viabilidad de las células MDR<sup>+</sup> y MDR<sup>-</sup> cuando se adicionó CsA o PSC833 a Doxorubicina o Vincristina. Los resultados obtenidos indican que el mecanismo de resistencia inducido por Doxorubicina o Vincristina en esas células no es a través de la Pgp-170 sugiriendo que otros mecanismos como la alteración de la unión intracelular de la droga o la alteración del target enzimático específico como la topoisomerasa II podrían estar involucrados.

**34. Inhibición por P21 de la apoptosis inducida por doxorubicina en células de cáncer de próstata humano que expresan p53 wild-type.** Nora Navone, María Vargas, Jun Yang, Matilde Olive, Elba Vazquez\*, Christopher Logothetis

*Department of Genitourinary Oncology, The University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Tx, USA; Departamento de Química Biológica, FCEN, Universidad de Buenos Aires.*

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muerte en EEUU. La doxorubicina (Dx), agente quimioterapéutico usado en el tratamiento del CaP, es un fuerte inductor de la expresión de p53 y de la transactivación de p21(WAF1/Cip1) (p21). Se sugirió que la inactivación de p53 cumple un rol en la resistencia a la quimioterapia y en la progresión del CaP. Dos líneas celulares derivadas de una metástasis ósea de CaP (MDA PCa 2a, MDA PCa 2b, Clin. Cancer Res. 3 (1997) 2493) y la línea celular LNCaP fueron expuestas a Dx (0,2-0,5-1 µg/ml) entre 0 y 72 hs. Se estudió la cinética de progresión del ciclo celular (FACS); apoptosis (ensayo del TUNEL; PARP cleavage), expresión de p53, p21, Bcl-2 (Western blot); P21, mdm2 (Northern blot); cdc2, cdk2 (inmunoprecipitación). La expresión de p53 fue dosis-tiempo dependiente. En contraste, la de p21 aumentó con 0,2 µg/ml de Dx, con supresión de la transcripción con 1 µg/ml de Dx. La expresión de Bcl-2 no se modificó y mdm2 mostró un patrón de expresión similar al de p21. La Apoptosis se detectó con 1 µg/ml de Dx, se suprimió con inhibidores de caspasas y se incrementó con antisense p21. Los resultados obtenidos por FACS muestran que hay arresto de células en G2 (0,2 µg/ml de Dx). Estas evidencias sugieren que la activación de caspasas estaría involucrada en la apoptosis inducida por Dx y que p21 jugaría un rol en la resistencia a la apoptosis inducida por Dx en células de próstata que expresan p53 wild-type.

## METABOLISMO

### 35. Efecto de la gangliectomía cervical superior sobre el contenido mineral y la densidad ósea de la mandíbula de la rata. Marta Ladizesky, Rodolfo Cutrera, Verónica Boggio, Carlos Mautalen, Daniel Cardinali

*Hospital de Clínicas y Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

El metabolismo óseo depende fundamentalmente de los osteoblastos y osteoclastos. Estas células juegan un rol básico en la síntesis y degradación del tejido osteoide y su subsecuente mineralización y desmineralización. Estos procesos están bajo la influencia de varios factores sistémicos y locales (auto-paracrinos). El sistema nervioso autonómico es uno de ellos. Para valorar el efecto de la gangliectomía cervical superior (Gx) sobre el crecimiento, el contenido mineral y la densidad mineral de las mandíbulas, ratas hembras de 21 días fueron hemigangliectomizadas, y luego de 15 ó 30 días, sacrificadas. Las hemimandíbulas fueron disecadas y pesadas. Se evaluó: el peso (x100g peso corporal), el contenido mineral (BMC) y la densidad mineral (BMD) óseas utilizando un densitómetro por doble haz de rayos X (Lunar Radiation Corp.) con un programa informático adaptado para pequeños animales. Treinta días post-Gx, se encontró un incremento significativo en el peso de las hemimandíbulas ipsilaterales a las Gx, comparado a las controles contralaterales ( $t=3.256$ ,  $p<0.001$ , Test Student apareado). Treinta días post-Gx, el BMC fue significativamente menor en las hemimandíbulas ipsilaterales a la Gx ( $0.364 \pm 0.046$  gr vs.  $0.432 \pm 0.055$  gr;  $t=3.607$ ,  $p<0.001$ ). El BMD fue también significativamente menor en las hemimandíbulas ipsilaterales a la Gx, 30 días post-Gx ( $0.117 \pm 0.013$  gr/cm<sup>2</sup> vs.  $0.139 \pm 0.015$  gr/cm<sup>2</sup>;  $t=3.950$ ,  $p<0.001$ ). Los resultados indican que una simpatectomía regional causa alteraciones cualitativas ya sea en el modelamiento así como en el remodelamiento óseo, conduciendo a un incremento en la reabsorción.

### 36. Modelo de múltiples dosis bajas de estreptozotocina en ratón: estudio evolutivo. Claudia Pastorale, Eduardo Dascal, Liliana Karabatas, Lidia Bruno, Juan Basabe

*Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños R. Gutierrez, Buenos Aires.*

La inyección de múltiples dosis bajas de estreptozotocina (mdb-SZ) en ratones causa una diabetes autoinmune de aparición gradual. Células mononucleares de bazo (CMN) de estos ratones (CMN "diabet.") transfieren alteraciones en la secreción de insulina

(SI) al ser inyectadas en receptores singeneicos. Se inyectaron ratones C57BL/6J con mdb-SZ (40 mg/Kg en 5 días consecutivos) o con vehículo. Los bazos se extrajeron a los 4, 6, 9, 12 y 16 días post-1era inyección y las CMN fueron utilizadas para: a) estudiar la agresión inmune celular "in vitro" (AIC) co-cultivando CMN con células dispersas de islotes de rata y evaluando SI al medio; b) medir la producción de óxido nítrico (NO) en cultivos de CMN y c) transferir CMN, obtenidas a los 9 y 16 días, cultivadas sin o con 0,5 mM de L-N-monometil arginina (LNMMMA), a ratones receptores en los que se evaluó SI en perfusión de islotes. Los datos muestran que las CMN "diabet." presentan: AIC desde el día 4 ( $p<0,01$ ) que se agrava al día 12 ( $p<0,01$ ); aumentada producción de NO en todos los tiempos estudiados ( $p<0,01$ ) con un pico al día 6. Además, las CMN de ratones con mdb-SZ, aisladas a los 9 y 16 días, transfieren alteraciones en la SI en los ratones receptores ( $p<0,01$  vs receptores de espl. control). La incubación previa con LNMMMA recupera parcialmente la SI en los animales receptores de CMN "diabet." obtenidas al día 9 (SI en uU/5 min/islote:  $6,99 \pm 0,30$  vs  $5,02 \pm 0,16$ ,  $n=6$  y  $4$ ,  $p<0,01$ ), pero no al día 16. Los resultados sugieren una aparición temprana de agresión funcional anti célula beta en las CMN "diabet.", que al menos en parte, puede responder a la producción de NO.

### 37. Efecto del hipotiroidismo sobre el metabolismo de los lípidos en hígado y glándula mamaria de ratas preñadas a término y día 20 de lactancia. Belén Hapon, Silvia Varas, \*Graciela Jahn, Sofía Giménez.

*Cátedra de Bioquímica Molecular. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. \*Laboratorio de Reproducción y Lactancia-CONICET, Mendoza.*

Es conocido el efecto del hipotiroidismo sobre el metabolismo de los lípidos, pero hay escasa información respecto al efecto del mismo durante la preñez y lactancia. Resultados previos mostraron una disminución en las actividades de Ácido Graso Sintetasa (AGS) y Acetil CoA Carboxilasa (ACC) en glándula mamaria, mientras que no se modificaron en hígado en ratas G<sub>21</sub> (Varas y col, SLAT, 1999). Se consideró de interés analizar el efecto del hipotiroidismo crónico sobre el metabolismo lipídico en glándula mamaria e hígado de ratas preñadas a término (G<sub>21</sub>) y día 20 de lactancia (L<sub>20</sub>). Se usaron ratas de la cepa Wistar hembras de 200-250 g de peso inicial que recibieron propiltiouracilo (100 mg/l) en el agua de bebida (Hp). Controles bebieron agua sin PTU (Co). El tratamiento comenzó una semana previa al apareamiento y continuó hasta el día 21 de gestación y 20 de lactancia. Se midió la actividad de ACC y AGS y previa extracción de los lípidos totales las distintas lípidos fueron separados por TLC. Se cuantificaron triglicéridos (Tg), fosfolípidos (PL) y colesterol libre (C<sub>L</sub>) y esterificado (C<sub>E</sub>). El hipotiroidismo produce en G<sub>21</sub>: en hígado un aumento de la concentración de Tg ( $1258.4 \pm 60.0$  vs  $785.6 \pm 5.1.7$  µg/g. tej) y disminución de la de PL ( $682.8 \pm 56.9$  vs  $1094.2 \pm 34.6$  µg/g. tej); en glándula mamaria un aumento de la concentración de Tg ( $12.28 \pm 0.79$  vs  $7.95 \pm 0.94$  µg/g. tej) y de C<sub>L</sub> ( $6.18 \pm 0.11$  vs  $5.46 \pm 0.18$  mg/g.tej). En L<sub>20</sub> no se modificó la actividad de las enzimas lipogénicas. Los resultados obtenidos muestran en G<sub>21</sub> una caída de la actividad de ACC en GM producto de una mayor disponibilidad de ácidos grasos asociado a un retraso de los eventos de lactogénesis.

### 38. El peroxinitrito inhibe selectivamente la actividad del complejo I mitocondrial. Natalia Riobó, Mariana Melani, Alberto Boveris, Juan José Poderoso

*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno. Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires. Laboratorio de Biología de los Radicales Libres. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Previamente, observamos que el óxido nítrico (-NO) inhibe la actividad del complejo I mediante la formación de peroxinitrito (ONOO-) intramitocondrial. Para determinar si el ONOO- exógeno también actúa en forma selectiva sobre el complejo I, se estudió

su efecto sobre el consumo de  $O_2$  por mitocondrias de rata y sobre la actividad de los complejos I y II de partículas submitocondriales (PSM) mediante la reducción sustrato-específica de quinol ( $Q_0$ ) y citocromo *c* (cit *c*). En presencia de 6 mM malato/ glutamato, sustrato del complejo I, el consumo de  $O_2$  de mitocondrias de cerebro fue inhibido por ONOO<sup>-</sup> de manera dosis dependiente al igual que la velocidad de reducción de  $Q_0$  (actividad del sitio I) y de cit *c* (actividad de los sitios I-III) por PSM suplementadas con 0,1 mM NADH ( $IC_{50} \approx 100 \mu M$ ,  $n=5$ ). Por el contrario, en presencia de succinato, sustrato del complejo II, el efecto del ONOO<sup>-</sup> sobre el consumo de  $O_2$  y la reducción de cit *c* resultó mucho menor ( $IC_{50} \approx 0.75-1 \mu M$ ,  $n=5$ ). La inhibición del complejo I por ONOO<sup>-</sup> fue mayor en mitocondrias aisladas de tejidos con baja concentración de ubiquinol ( $Q_{10}$ ) como el cerebro;  $p < 0.05$ . La nitración de tirosinas producida por 25 y 50  $\mu M$  ONOO<sup>-</sup>, analizada por Western blot, resultó mayor en PSM de cerebro que de corazón (alta concentración de  $Q_{10}$ ). Los resultados indican que el ONOO<sup>-</sup> exógeno afecta preferencialmente la actividad del complejo I mitocondrial y que su acción es prevenida, en parte, por el ubiquinol.

**39. El óxido nítrico inhibe el complejo I mitocondrial a través de la formación de peroxinitrito.** Natalia Riobó, Mariana Melani, Alberto Boveris, Juan José Poderoso

*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas y Laboratorio de Biología de los Radicales Libres, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

La exposición de ciertos tipos celulares a bajas concentraciones de óxido nítrico (NO), conduce a la inhibición irreversible del complejo I mitocondrial (NADH- $Q_0$  reductasa). Con el objeto de analizar si el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), formado por reacción del NO y el anión superóxido ( $O_2^-$ ) generado en la cadena respiratoria, contribuye al mecanismo de inhibición, realizamos experimentos en mitocondrias y partículas submitocondriales (PSM) aisladas de diferentes tejidos de rata. La incubación de mitocondrias (1 mg/ml) o PSM (0,1 mg/ml) de hígado con 1-5 pulsos de 0,5  $\mu M$  NO en presencia de sustrato de complejo I (6 mM malato/ glutamato ó 0,1 mM NADH) o de complejo II (6 mM succinato), inhibió selectivamente el consumo de  $O_2$  dependiente de complejo I ( $n=3$ ). Del mismo modo, la incubación de PSM de corazón y cerebro con succinato y 1  $\mu M$  NO (liberado por DETA-NO) inhibió la actividad NADH- $Q_0$  reductasa ( $85 \pm 10.4$  vs  $19.3 \pm 5.2 \mu M Q_0/H_2$ ,  $min^{-1} mg$   $prot^{-1}$ ,  $n=6$ ;  $p < 0.05$ ), que fue prevenida por 10  $\mu M$  SOD y 2 mM ácido úrico (atrapador de ONOO<sup>-</sup>), pero no modificó la actividad succinato- $Q_0$  reductasa. La formación de ONOO<sup>-</sup> en PSM de hígado expuestas a 1  $\mu M$  NO por 1 y 2 hs se detectó por Western blot con anticuerpos antinitrotirosina. La inhibición del complejo I se correlacionó con la producción de  $O_2^-$  y de ONOO<sup>-</sup> de cada tejido. Los resultados indican que el mecanismo de inhibición del complejo I por NO implica la formación de ONOO<sup>-</sup> intramitocondrial

**40. Inducción de óxido nítrico sintasa en mitocondrias de diafragma.** Constanza Lisdero, Jorge Boczkowski, Cecilia Carreras, Juan J. Poderoso

*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires y Unidad INSERM 408, París, Francia.*

Recientemente, hemos observado que en la endotoxemia hay inducción de óxido nítrico sintasa (NOS) en el músculo diafragmático. El aumento de NO genera un aumento en la producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) mitocondrial con la concomitante formación de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). El peroxinitrito, nitrógeno proteínas mitocondriales modificando sus actividades enzimáticas generando un deterioro de la función contráctil. El objetivo de este estudio fue determinar si existe una localización mitocondrial de la iNOS que pueda contribuir a la formación de ONOO<sup>-</sup> intramitocondrial. El estudio fue realizado en ratas Sprague-Dawley y la sepsis se indujo por la administración i.p. de LPS de E.coli (2 mg/kg). Los animales se sacrificaron a las 24 hs y se estudió la pre-

sencia de iNOS por Western Blot, la actividad enzimática y el requerimiento de cofactores de la NOS en diferentes fracciones subcelulares de diafragma. Los resultados mostraron que las mitocondrias aisladas y purificadas de animales sépticos expresan iNOS, y presentan una actividad de NOS  $Ca^{2+}$  independiente ( $13 \pm 3$  en sépticos vs.  $3.4 \pm 1.5$  pmoles/min/mg en controles,  $p < 0.05$ ). Esta enzima localizada en la membrana interna mitocondrial no requiere la presencia de sustratos de la NOS. Se concluye que la mitocondria es una fuente de producción de  $O_2^-$ , NO y ONOO<sup>-</sup>, y que la NOS mitocondrial puede jugar un papel importante en la fisiopatología de la sepsis.

## TRANSPORTE

**42. Corrientes iónicas en ovocitos de Bufo arenarum.** Sebastián Godoy, Alicia Damiano, Carlos Kusnier, Cristina Ibarra, Horacio Cantliello, Basilio A. Kotsias

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Laboratorio de Canales Iónicos, Facultad de Farmacia y Bioquímica e Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Universidad de Buenos Aires.*

Presentamos los resultados de las características de las corrientes iónicas en ovocitos de Bufo arenarum obtenidos por disociación en colagenasa y equilibrados en solución Barth control (mM, NaCl 96, KCl 2,  $CaCl_2$  1.8, Hepes 5, pH 7.4), y estudiados con la técnica de potencial controlado por medio de dos microelectrodos intracelulares. Los valores de resistencia de membrana obtenidos por la aplicación de un pulso hiperpolarizante de -100 mV a partir del pb son los siguientes:  $0.38 \pm 0.11 M\Omega$ , SD,  $n=28$ ). A partir de un potencial de base (pb) = -40 mV, los pulsos hiperpolarizantes de hasta -100 mV dieron lugar a corrientes estables en tanto que los pulsos despolarizantes activaron corrientes dependientes del tiempo, observándose en algunos ovocitos (3/39) respuestas compatibles con los potenciales de fertilización descritos en otras preparaciones. En 8 ovocitos los valores de corriente obtenidos fueron a -60 mV:  $-0.10 \pm 0.06 \mu A$  (SD) en tanto que a +60 mV de  $0.77 \pm 0.41 \mu A$ , indicando una rectificación saliente de las corrientes medidas. El reemplazo del  $Cl^-$  extracelular por gluconato no resultó en una disminución en las corrientes, sugiriendo que estos canales son permeables a aniones orgánicos. Nuestros resultados indican que los ovocitos de B. arenarum son una preparación apta para estudios de canales iónicos mediante el sistema de potencial controlado.

**43. Potencial de acción (PA) en músculo esquelético desnervado (MD).** Roque A. Venosa<sup>1</sup>, Basilio A. Kotsias<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata; <sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Universidad de Buenos Aires.

El MD de rata se despolariza ~20 mV (4º a 6º día) por aumento de la permeabilidad al  $Na^+$  ( $P_{Na}$ ) y reducción de  $P_K$  (Kotsias, Venosa, J. Physiol. 392: 301, 1987). La desnervación también reduce el pico del PA (PPA). Estudiamos parámetros que pudieran determinar la alteración del PA en músculos EDL homólogos innervado (MI) y MD de rata Wistar, mediante electrofisiología convencional, medición de flujos isotópicos y de concentraciones iónicas.  $P_{Na}$  de reposo en MI fue  $49.6 \pm 2.6 pm.s^{-1}$  (ES) y  $91.9 \pm 15.0 pm.s^{-1}$  en MD de 6 días. La tetrodotoxina (2  $\mu M$ ) redujo  $P_{Na}$  de MI en 10.8  $pm.s^{-1}$  y en 24.5  $pm.s^{-1}$  la de MD(6 días), indicando que el aumento de  $P_{Na}$  en MD ocurre por canales dependientes e independientes del potencial.  $[Na^+]_i$  fue  $20.2 \pm 1.2 mM$  en MI,  $24.2 \pm 1.4 mM$  en MD (4 días) y  $26.0 \pm 2.5 mM$  en MD(6 días). El flujo de  $Na^+$  por PA ( $J_{Na}$ ) fue de  $20.0 \pm 3.8 nmol.g^{-1}.PA^{-1}$  en MI y de  $11.1 \pm 1.0 nmol.g^{-1}.PA^{-1}$  en MD(6 días). Los valores del potencial de reposo (V), PPA y  $dV/dt_{max}$  (expresión de la corriente de  $Na^+$ ) fueron respectivamente:  $-73.5 \pm 0.5 mV$ ,  $24.1 \pm 0.7 mV$  y  $305 \pm 14 V/s$  en MI y  $-57.9 \pm 0.6 mV$ ,  $6.6 \pm 0.9 mV$  y  $188 V/s$  en MD(6 días). En MD(6 días) hiperpolarizados a -90 mV, se obtuvo: PPA =  $16.0 \pm 0.7 mV$  y  $dV/dt_{max} = 386 \pm 9$

V/s. Conclusión: la reducción de los parámetros eléctricos y de  $J_{Na}$  en MD se debería a: 1) disminución de la fuerza impulsora ( $E_{Na} - V$ ); 2) aumento del número de canales de  $Na^+$  inactivados por despolarización.

**44. Evaluación morfológica y funcional de los efectos de la toxina shiga sobre colon de rata.** <sup>1</sup>Fernando Martín, <sup>2</sup>Mariano Fernández Miyakawa, <sup>3</sup>Elsa Zotta, <sup>2</sup>Claudia Silberstein y <sup>2</sup>Cristina Ibarra

<sup>1</sup> Laboratorio de canales iónicos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; <sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

*Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) es responsable de una variedad de síntomas clínicos que incluyen diarrea acuosa y sanguinolenta, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). En estudios previos realizados en colon de rata y humano hemos demostrado que la toxina pura Shiga tipo 2 (Stx2) a concentraciones  $2 \times 10^7$  DC50/ml después de 60 min de exposición fue capaz de inhibir el transporte neto de agua y producir una alteración del epitelio superficial. El objetivo del presente trabajo es ensayar los sobrenadantes de *E. coli* conteniendo Stx2 clonada en pGEM-T a fin de conocer el efecto citotóxico de las subunidades A y B sobre el epitelio colónico. El flujo neto absorptivo de agua ( $J_w$ ), la diferencia de potencial transepitelial (DP) y la corriente de cortocircuito (Isc) se midieron mediante un dispositivo experimental puesto a punto en el laboratorio. La incubación sobre el lado mucoso del colon de rata durante 50 min con Stx2 a concentraciones de  $7 \times 10^3$  DC50/ml produjo: a) una disminución significativa de  $J_w$  sin afectar el DP y la Isc y b) una lesión de moderada a severa que corresponde a la destrucción de los 2/3 de la superficie mucosa. Estos resultados sugieren que la disgregación del epitelio colónico sería el responsable de la alteración del flujo neto de agua. La dosis de Stx2 utilizada para producir los mismos efectos que aquellos informados para Stx2 pura fue 3000 veces menor lo que indicaría que otros factores bacterianos contribuirían a la actividad citotóxica de la toxina.

**45. Efecto del  $Li^+$  sobre el flujo de  $Mn^{2+}$  estimulado por trombina en plaquetas sanguíneas.** Oscar Gende

Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata.

Para establecer si el reemplazo del sodio extracelular ( $Na^+$ ) por N-metilglucamina ( $NMG^+$ ) o litio ( $Li^+$ ) altera el ingreso de iones bivalentes inducido por trombina, se determinó la pendiente de apagamiento ( $\Delta$ fluorescencia/seg. $10^5$ ) por  $Mn^{2+}$  en plaquetas cargadas con FURA-2. Luego de 10 min en  $[Ca^{2+}]_i = 1$  mmol/l hay diferencias estadísticamente significativas (\*) entre el apagamiento por  $Mn^{2+}$  en  $Na^+$  ( $29 \pm 5$ ), en  $NMG^+$  ( $64 \pm 11^*$ ) o en  $Li^+$  ( $152 \pm 27^*$ ). La estimulación con trombina provoca un aumento del flujo en  $Na^+$  ( $746 \pm 63$ ) que es menor en  $Li^+$  ( $528 \pm 81^*$ ) o  $NMG^+$  ( $64 \pm 11^*$ ). Después de 100 seg. la entrada vuelve a ser menor en  $Na^+$  ( $13 \pm 4$ ) que en  $NMG^+$  ( $46 \pm 7^*$ ) o  $Li^+$  ( $100 \pm 24^*$ ). Después de 10 in de incubación en  $[Ca^{2+}]_i = 0$  el apagamiento por  $Mn^{2+}$  fue  $131 \pm 13$  en  $Na^+$  y  $151 \pm 20$  en  $Li^+$ . La estimulación con trombina provoca un aumento del flujo mayor en  $Na^+$  ( $366 \pm 81$ ) que en  $Li^+$  ( $257 \pm 52^*$ ). Se concluye que el reemplazo de sodio por litio provoca una entrada basal de cationes bivalentes, reduce la entrada provocada por trombina y mantiene la entrada tardía luego del agonista. La reducción de las diferencias entre ambos grupos en ausencia de calcio sugiere que el litio impide el cierre de canales operados por el relleno del reservorio manteniendo la entrada "capacitiva" del calcio.

**46. Expresión del ARNm de la acuaporina 9 en ovocitos de rata Estudios en distintos estadios de maduración.** Paula Ford<sup>1</sup>, Jean Merot<sup>2</sup>, Alicia Jawerbaum<sup>3</sup>, Martha Gimeno<sup>3</sup>, Claudia Capurro<sup>1</sup>, Mario Parisi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires;

<sup>2</sup> Service de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Saclay, CEA, France <sup>3</sup> Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO-CONICET).

La maduración del ovocito de mamíferos es un proceso sumamente complejo que involucra cambios en las actividades metabólicas, sintéticas, así como en la estructura y función de la membrana. Nosotros en estudios anteriores encontramos que la permeabilidad osmótica del ovocito cambiaba al madurar, siendo mayor la del ovocito inmaduro. El objetivo de nuestro trabajo fue ver si esta alta permeabilidad se debía a la presencia de algún canal específico para el pasaje de agua (acuaporinas). Hasta ahora se han clonado en mamíferos nueve acuaporinas diferentes. Para ver si alguna de ellas estaba presente utilizamos la técnica de RT-PCR, usando primers específicos para cada una de las acuaporinas. Encontramos que el ARNm de la acuaporina 9 (AQP9), esta presente en ovocitos inmaduros pero no en los maduros. La AQP9 ha sido recientemente clonada y se ha encontrado en hígado y en espermatozoides inmaduros. De nuestros estudios podemos concluir que durante el proceso de maduración la permeabilidad osmótica disminuye y esto se correlaciona con la desaparición de la expresión del ARNm de AQP9. Es importante destacar que es la primera vez que se describe la presencia de una acuaporina en ovocitos, es por ello que nuestra perspectiva es estudiar la regulación de esta proteína en condiciones normales y patológicas.

## ENDOCRINOLOGIA II

**47. La norepinefrina inhibe la expresión del gen de tiroglobulina (Tg) en cultivos de tiroides de rata.** Guillermo Juvenal, Pablo Nosedá, Lisa Thomasz, Marcos Agote, Laura Bocanera, Alejandra Dagrosa, León Krawiec, Mario Pisarev

Bioquímica Nuclear. Comisión Nacional de Energía Atómica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La función tiroidea está regulada por varios factores además de la TSH. Trabajos previos demostraron que el sistema nervioso simpático juega un papel importante en el crecimiento y función tiroidea. En cultivos de células tiroideas observamos que la NE inhibe la captación de yodo. Se estudió la acción del neurotransmisor sobre la síntesis de la Tg. Se incubaron células de tiroides de rata (FRTL-5) con y sin TSH (0.5 mU/ml) y/o NE (5  $\mu$ M) durante 48 hs. Para medir la Tg sintetizada las células luego de los tratamientos se incubaron con <sup>35</sup>S-metionina 1 h. y se midió la cantidad de Tg por inmunoprecipitación La NE inhibió en un 46% el estímulo de TSH. Se realizaron mediciones del ARNm de Tg así como la estabilidad del mismo, agregando actinomicina D, por Northern Blot. La NE inhibió en un 50% la estimulación por parte de la TSH sin modificar la estabilidad del ARNm. Se transfectoron células tiroideas con plásmidos conteniendo regiones del promotor de Tg que abarcan desde -1 a -3kb adosados al gen codificante de la cloranfenicolacetiltransferasa (CAT). La NE inhibió el estímulo, en todas las construcciones, de la actividad de la CAT por parte de la TSH en un 50%. La NE no tiene efecto sobre los valores basales debido a que en ausencia de TSH se depletan los receptores  $\alpha_1$  a través de los cuales actúa la NE. Conclusión: la NE inhibe la síntesis de Tg a nivel de la transcripción.

**48. Efecto del hipertiroidismo en la expresión genética de los IGFs y sus proteínas de unión en ratas de un día de edad.**

Roberto Rosato, Dicky Lindenbergh-Kortleve, Graciela Jahn

Laboratorio de Reproducción y Lactancia, LARLAC-CRICYT, Mendoza.

El hipertiroidismo (HT) en ratas vírgenes produce hipertrofia de órganos y aumento en los niveles de IGF I y de su proteína transportadora principal, BP-3. La preñez produce una marcada atenuación de los efectos metabólicos del HT en las madres y sus fetos. Además, el cambio de predominio de IGF II y BPs 2 y 4 a IGF I y BP 3 producido en los primeros días de vida, es de-

morado por el hipotiroidismo. Como los IGFs están implicados en el crecimiento y diferenciación de estos tejidos, estudiamos el efecto del HT, inducido por inyecciones diarias de  $T_4$  (0.25 mg/k) a las madres, sobre los niveles de GH y PRL y la expresión genética de IGF I, II y las BPs 1 a 5 en el hígado, riñones, pulmones y corazón de crías de un día de edad, por PCR cuantitativo e hibridación *in situ*. El HT materno aumentó la GH (co:  $20 \pm 8$ , HT:  $80 \pm 4$  ng/ml), pero no modificó PRL ni  $T_3$  séricas en las crías. El IGF I medido por PCR-Q estuvo disminuido en hígado (co:  $11 \pm 2$ , HT:  $4 \pm 1$  moléculas/ $\mu$ g RNA  $\times 10^6$ ), pero aumentado en riñón (co:  $1.1 \pm 0.2$ , HT:  $1.9 \pm 0.2$ ) y corazón (co:  $1 \pm 0.2$ , HT:  $2.7 \pm 0.2$ ), mientras que el IGF II aumentó en corazón (co:  $159 \pm 22$ , HT:  $368 \pm 35$ ). No hubo diferencias entre controles y HT en las BPs 1, 3, y 5, mientras que la BP 2 aumentó (co:  $66 \pm 6$ , HT:  $114 \pm 17$ ) y la BP 4 cayó (co:  $78 \pm 4$ , HT:  $57 \pm 2$ ) en hígado de las crías HT. Así, el HT materno afectó tanto la GH sérica como la expresión de IGFs y sus BPs en las crías, principalmente en hígado, pero no se observó un efecto inverso al del hipotiroidismo en todos los parámetros.

#### 49. Tiroiditis autoinmune y ptosis palpebral. Alejo Florin-Christensen.

*Departamento de Medicina. CEMIC (Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas). Buenos Aires.*

Basados en la observación clínica de mujeres con tiroiditis autoinmune que presentaban ptosis palpebral unilateral asintomática nos llevaron a investigar si la misma era debida a una miastenia gravis ocular asociada. Se estudiaron 17 mujeres (18 a 67 años) con tiroiditis autoinmune (10 con enfermedad de Hashimoto, 4 con tiroiditis atrófica y 3 con tiroiditis autoinmune eutiroidea). Ninguna tenía enfermedad de Graves. **Métodos:** T3, T4 y T4L se midieron por radioinmunoensayo, TSH se midió por IRMA de 2° generación o electroquimioluminiscencia. Los anticuerpos anti peroxidasa tiroidea y anti tiroglobulina se midieron por aglutinación y ELISA ultrasensible. Los anticuerpos contra el receptor de acetilcolina se midieron por un bioensayo con bungarotoxina radioactiva. El estudio electromiográfico de los párpados se hizo por el método convencional, fibra única y reflejo múltiple del parpadeo. El diámetro anteroposterior del ojo y la ptosis palpebral se midieron con un exoftalmómetro Philips. La respuesta al edrofonio se midió con el mismo aparato. **Resultados:** Las enfermas estudiadas presentaron anticuerpos tiroideos de una o ambas especificidades. Ni sus títulos ni las concentraciones hormonales ni el tratamiento con tiroxina presentaron relación con la ptosis palpebral. Los anticuerpos anti receptor de acetilcolina fueron negativos y los electromiogramas fueron normales. No hubo respuesta a la prueba de edrofonio. La ptosis palpebral no empeoraba al pasar las horas. **Conclusión:** Hay una asociación entre ptosis palpebral y tiroiditis autoinmune que no está relacionada a una miastenia asociada.

#### 50. Interacciones músculo/hueso en el raquis humano determinadas por QCT axial. Ricardo Capiglióni, Emilio Roldán, Ricardo Capozza, Gustavo Cointry, Carlos Giménez, José Ferretti

*pQCT-Biociencia, Buenos Aires; Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Rosario.*

Hemos descripto asociaciones entre indicadores musculares y óseos densitométricos en cuerpo entero, y tomográficos en antebrazo y tibia humanos. Ahora las analizamos en scans tomográficos axiales tomados a la altura de la vértebra L3, con referencia al ángulo de cifosis (Ac, proporcional a la curvatura raquídea) determinado entre las vértebras T4 y T12 en radiografías de tórax de perfil, en 90 mujeres normales pre o post menopáusicas (MP) y en 5 hombres. Los indicadores óseos correlacionaron negativamente con el Ac, especialmente el contenido mineral vertebral total y la densidad mineral volumétrica del núcleo trabecular. Las áreas de sección musculares libres de grasa (AM) ventrales y dorsales correlacionaron negativa pero menos ajustadamente con el Ac, y positiva y muy significativamente con las

variables óseas (siempre  $p < 0.001$ ). Los datos masculinos respetaron esas asociaciones. Correlaciones múltiples mostraron que las variables óseas eran determinantes exclusivas del Ac, y que las AM eran determinantes casi exclusivas de las variables óseas, junto con el tiempo postMP. Ningún factor antropométrico explicó la variancia residual del Ac. Aparte de evidenciar interacciones músculo/hueso en una región esquelética poco estudiada, estos datos aconsejan ajustar las variables absorciométricas óseas a sus determinantes específicos (indicadores musculares regionales) previo a su aplicación al diagnóstico de osteoporosis.

#### 51. Análisis biomecánico del deterioro postmenopáusico de la calidad ósea tibial por tomografía periférica (pQCT). Ricardo Capiglióni, Emilio Roldán, Ricardo Capozza, Gustavo Cointry, José Ferretti.

*pQCT-Biociencia, Buenos Aires; Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Rosario.*

Hemos desarrollado un método de selección de umbrales de atenuación para definir rangos específicos de densidad mineral volumétrica tibial (HD, >800, hueso cortical denso; MD, 400-800, hueso cortical poroso o subcortical; LD, 200-400 mg/cm<sup>3</sup>, hueso trabecular) y lo aplicamos al análisis de scans de pQCT de pantorrilla de 12 mujeres premenopáusicas (preMP) de 41 años de edad promedio, y otras 12 con más de 15 años de postMP, sin antecedentes osteológicos. Las preMP mostraron 16% más de hueso HD y 20% menos de MD que las postMP ( $p < 0.01$  ambas), sin diferencias en LD. Nuestro índice tomográfico de resistencia ósea (Stress-Strain Index = densidad mineral  $\times$  momento de inercia del área seccional cortical) varió paralelamente con la proporción de hueso HD ( $r = 0.86$ ,  $p < 0.001$ ), independientemente de la menopausia. Las postMP se distinguieron también cualitativamente por presentar discontinuidad geométrica de la región HD, distribución preferencial del hueso LD a lo largo del eje seccional mecánicamente menos efectivo, y desintegración de la cortical del peroné. Estos datos constituyen un recurso original para calificar la afectación cortical en mujeres postMP, complementario del diagnóstico densitométrico de osteopenia (DEXA), para establecer un diagnóstico biomecánico de osteoporosis, imposible de concretar en base a la densidad ósea de proyección.

#### 52. Efectos del alendronato sobre los componentes elástico y plástico de resistencia femoral en ratas ovariectomizadas. Angelina Chiappe, Eduardo Alvarez, Gabriel Iorio, Ricardo Capozza, Gustavo Cointry, José Zanchetta, José Ferretti

*Facultades de Veterinaria y de Medicina, Universidades de Buenos Aires y de Rosario.*

Las diáfisis femorales de ratas sham u ovariectomizadas (OX) a los 3 meses y tratadas o no inmediatamente después con 5 ó 25  $\mu$ g/kg/d de alendronato (AHBP) por 6 meses ( $n = 15$ /grupo) se estudiaron tomográfica (pQCT) y mecánicamente en flexión, para analizar propuestos efectos diferenciales de esos tratamientos sobre los componentes elástico inicial (Wy) y plástico final (Wf-Wy) de resistencia a la deformación previa a la fractura (Wf). La OX redujo Wy y Wf, pero incrementó el componente plástico de resistencia (+40%,  $p < 0.05$ ). El AHBP previno la reducción de Wy y de Wf, aumentándolos por sobre el sham ( $p < 0.01$ ), y mantuvo aumentada la resistencia plástica. Estos efectos sólo podrían explicarse por cambios en el diseño seccional diafisario (que no se modificó), o en el módulo elástico del material cortical, que la OX redujo (-36%,  $p < 0.05$ ) y el AHBP mantuvo al nivel sham. Esa variación de calidad del material no fue atribuible a cambios en la mineralización (que hubieran afectado a Wy), sino en los otros determinantes microestructurales (porosidad, colágeno, cristales, microfrazas) que la pQCT no evalúa, y que deberían haber afectado a la resistencia plástica. Estos resultados inéditos pueden explicar la aparentemente paradójica falta de correlación entre los efectos positivos del AHBP sobre la densidad mineral ósea y sobre la incidencia de fracturas en recientes estudios clínicos de registro.

## TUMORES II

- 53. Responsabilidad de IL-10, TGF- $\beta$  y NO en la inhibición de metástasis por Ciclofosfamida.** <sup>1</sup>Pablo Matar, <sup>2</sup>Alejandro González, <sup>1</sup>Viviana Rozados, <sup>3</sup>Diana Dlugovitzky, <sup>2</sup>Daniel Bonfil, <sup>1</sup>Graciela Scharovsky

<sup>1</sup> Instituto de Genética Experimental, <sup>3</sup> Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, <sup>2</sup> Fundación de Investigación del Cáncer, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO), Buenos Aires

Anteriormente demostramos el efecto antimetastásico de una dosis baja y única de ciclofosfamida (Cy) sobre un linfoma de rata (L-TACB). Este efecto pudo ser transferido adoptivamente a animales normales con células esplénicas (CE) de ratas portadoras del tumor tratadas con Cy. En cambio, el mismo tratamiento no tuvo efecto antimetastásico en ratones *nude*. Con el objetivo de estudiar el mecanismo inmunopotenciador de la Cy, se determinó la concentración de interleuquina 10 (IL-10), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y óxido nítrico (NO) en medios condicionados (MC) de CE en cultivo, así como su actividad sobre la proliferación de CE. Los MC de CE de animales portadores del tumor inhibieron significativamente la proliferación celular a diferencia de los MC de CE de portadores de tumor tratados con Cy, y presentaron una concentración de IL-10 (Media  $\pm$  ES: 448  $\pm$  9 pg/ml) superior a las de los MC de CE de portador del tumor tratado con Cy (3  $\pm$  3 pg/ml) y CE de animales normales (83  $\pm$  41 pg/ml) ( $p < 0.001$ ). TGF- $\beta$  y NO presentaron tendencias similares. Se concluye que el tratamiento con una dosis baja y única de Cy en ratas portadoras de un tumor en crecimiento, restablecería la actividad linfoproliferativa normal (disminuida por el crecimiento tumoral), mediante una reducción en los niveles de producción esplénica de IL-10, TGF- $\beta$  y NO, favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune efectiva con efecto inhibidor sobre las metástasis.

- 54. Efecto de un antiestrógeno (AE) puro (ICI 182780) y de oligonucleótidos antisentido para el receptor de estrógeno tipo alfa (asRE) sobre el crecimiento de un adenocarcinoma mamario murino progestágeno dependiente (PD).** Caroline Lamb, Luisa Helguero, Alfredo Molinolo, Claudia Lanari.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Hemos demostrado que los receptores de progesterona (RP) tienen un papel esencial en la proliferación celular de adenocarcinomas mamarios murinos RP(+), mientras que el estradiol es inhibitorio. En cultivos primarios, se investigó la participación del receptor de estrógeno tipo alfa (RE $\alpha$ ) sobre la proliferación de una línea tumoral PD (C4-HD), y su interacción con el RP. Se evaluó el efecto del ICI 182780 y de un asRE del sitio de iniciación de la traducción del RE $\alpha$  sobre la proliferación celular inducida por acetato de medroxiprogesterona (MPA) 10nM usando suero depletado de esteroides. El AE fue inhibitorio sólo en concentraciones 10<sup>-6</sup>M (Ej. de 3 ensayos, control: 869  $\pm$  108cpm, ICI 10<sup>-6</sup>M: 586  $\pm$  64cpm). En cultivos estimulados con MPA se obtuvo una inhibición en la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina a partir de 10<sup>-8</sup>M (Ej. MPA: 2982  $\pm$  567cpm, MPA+ICI 10<sup>-8</sup>M: 2039  $\pm$  351cpm, MPA+ICI 10<sup>-6</sup>M: 988  $\pm$  152cpm). El asRE, 2,5 a 20  $\mu$ g/ml, sin efectos por sí mismo, inhibió la estimulación del MPA de manera similar al AE. ICI, 10<sup>-7</sup>M disminuyó (69%,  $p < 0.001$ ) la cantidad de RP evaluado por técnicas de unión al ligando. El AE o asRE no tuvieron efectos sobre fibroblastos estromales. Estos resultados sugieren que a) los RE en ausencia de ligando estarían involucrados en mantener los niveles de RP necesarios para que el MPA estimule la proliferación celular o b) una interacción entre RE y RP.

- 55. Acción de la histamina sobre la proliferación celular: un modelo de melanoma.** Gabriela Martín, Ezster Lazar\*, Zsuzsa Darvas\*, Rosa Bergoc, Carlos Fitzsimons, Claudia Cocca, Andras Falus\*, Elena Rivera, Graciela Cricco.

Laboratorio Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; \*Department of Genetics, Cell and Immunobiology, Semmelweis University of Medicine, Hungría.

Anteriormente hemos demostrado que en carcinomas mamarios experimentales y en una línea celular de carcinoma pancreático, la histamina (Hi) actúa como factor autocrino de crecimiento. Por otra parte, en biopsias de melanoma maligno detectamos elevada actividad de histidina decarboxilasa (HDC) y expresión de su ARNm. En este trabajo investigamos si la Hi puede regular la proliferación en células de melanoma. Se trabajó con 4 líneas de melanoma humano de distinta capacidad metastásica, en orden creciente: WM35, WM983, HT168 y M15. Sólo en la línea no invasiva, WM35 la Hi estimula significativamente la producción de AMPc en forma dosis dependiente (CE<sub>50</sub>=5  $\mu$ M) y con un máximo de estimulación de 30 veces el basal. Estudios de proliferación empleando la técnica de formación de colonias, demostraron que la Hi actuando a través del Receptor H<sub>2</sub> estimula la proliferación en WM35 (Control 74  $\pm$  4 col; Agonista H<sub>2</sub> 10  $\mu$ M: 97  $\pm$  3 col,  $p < 0.05$ , antagonista H<sub>2</sub> 10  $\mu$ M: 60  $\pm$  2  $p < 0.05$ ). El empleo de forskolina 10  $\mu$ M: (167  $\pm$  5 col,  $p < 0.01$ ), confirmó en este modelo la asociación del AMPc con la estimulación de la proliferación. Mediante RT-PCR y Western blot se determinó que todas las líneas expresan ARNm de HDC y proteína, siendo la WM35 la que muestran mayor expresión y actividad enzimática, seguida por la WM983. Estos resultados indican en principio que la histamina puede regular en forma autocrina la proliferación de células de melanoma en sus primeros estadios.

- 56. La histamina como mediador de la diferenciación celular en keratinocitos de ratón.** Carlos Fitzsimons, Nora Engel<sup>1</sup>, L.Policastro<sup>2</sup>, Irene Szijan<sup>1</sup>, Hebe Durán<sup>2</sup>, Beatriz Molinari<sup>2</sup>, Elena Rivera

Laboratorio Radioisótopos, <sup>1</sup>Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; <sup>2</sup>Laboratorio Tandar, Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires

La diferenciación de los keratinocitos de ratón es modulada por la concentración extracelular de Ca<sup>2+</sup>. El aumento del [Ca<sup>2+</sup>] extra-celular activa la PLC, con activación de PKC y expresión de marcadores de diferenciación como Transglutaminasa K (TGK). Previamente demostramos la expresión de receptores a histamina H<sub>2</sub> (RH<sub>2</sub>) en keratinocitos, que pueden asociarse funcionalmente a la activación de PLC. Se trabajó con células murinas PB, derivadas de papiloma, crecidas con bajo [Ca<sup>2+</sup>]=0.05 mM y alto [Ca<sup>2+</sup>]=1.2 mM. Se evaluó la diferenciación fenotípicamente y a través de la expresión de TGK por Northern Blot. La expresión de TGK sólo fue positiva en PB crecidas con alto [Ca<sup>2+</sup>]. Ensayos de unión con <sup>3</sup>H-Tiotidina mostraron que el n° de sitios H<sub>2</sub> (Kd=18  $\pm$  4 nM) disminuye en las células diferenciadas vs las indiferenciadas [(18.17  $\pm$  2.16 vs. 27  $\pm$  0.87)  $\times 10^4$ ,  $p < 0.05$ ]. El estudio de la regulación de expresión de ARNm de RH<sub>2</sub> por Northern blot y RT-PCR mostraron una expresión nula del transcrito en las células diferenciadas mientras que la expresión fue significativamente alta en las PB indiferenciadas. Concomitantemente, estudios de funcionalidad midiendo la producción de inosítoles fosfato, indican que el RH<sub>2</sub> pierde su capacidad de activar la PLC en las células diferenciadas. Estos resultados muestran que la expresión del RH<sub>2</sub> es regulada negativamente durante la diferenciación de células PB afectando la asociación a los segundos mensajeros, con las consecuentes implicancias en el proceso de diferenciación.

- 57. Controversias médicas en estudios genéticos en cáncer hereditario: Cáncer de mama (BRCA), Neoplasia Endócrina Múltiple (MEN) y Adenopolioposis Colónica Familiar (FAP).** Dourisboure Ricardo<sup>1</sup>, Belli Susana<sup>2</sup>, Storani María<sup>3</sup>, Viniegra María<sup>1</sup>, Barugel Mario<sup>4</sup>, Chacón Reinaldo<sup>1</sup>, Podestá Ernesto<sup>5</sup>, Solano Angela<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Instituto A. Fleming, <sup>2</sup>Hospital Durand, <sup>3</sup>Hospital de San Isidro, <sup>4</sup>Hospital Udaondo y <sup>5</sup>Laboratorio HRDC-Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Hay tres grupos de estudios genéticos: a) los que su resultado cambia la rutina clínica (MEN, carcinoma medular de tiroides familiar -CMTF-, FAP, etc), b) los que brindan posibles beneficios con la identificación de mutación germinal (colon, BRCA) y c) los aún poco claros (melanoma, etc). **Objetivo:** Estudiar las controversias médicas y éticas en la aplicación del conocimiento de mutaciones germinales en cáncer hereditario. **Metodología:** Las mutaciones se estudiaron utilizando los métodos de ensayo de proteína truncada (FAP), PCR y secuenciación (BRCA; MEN; CMTF; FAP). **Resultados:** En 13 casos índice se detectó la mutación germinal familiar, 2 MEN, 3 CMTF, 2 BRCA y 6 FAP. En 1 CMTF se detectó una mutación novel. En el estudio de los individuos con riesgo de las 13 familias se detectaron 19 mutados y 29 normales. Al informe del resultado, encontramos estas principales controversias médicas no amparadas en el consenso internacional: a) posición legal en tratamiento de riesgo a individuos sanos con mutación; b) en la solicitud de consentimiento no existe legislación ni consenso aun para casos con indicaciones definidas como MEN o CMTF; c) interpretación de una mutación germinal nunca descripta anteriormente, como la hallada en la familia con CMTF. **Conclusiones:** es imprescindible definir consenso en actitudes clínicas y éticas en nuestro medio; fijar precedentes a través de las sociedades científicas para una futura legislación; fomentar la formación de equipos interdisciplinarios.

**58. Vacunas en pacientes con melanoma metastásico Estadio III. Actualización de sobrevida libre de enfermedad en un protocolo de Fase II no randomizado.** Jose Mordoh, Laura Bover, Claudia Kairiyama, Cynthia López Haber, Adriana Deganutti, Mariano Ochoa

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas - "Fundación Campomar". Centro de Investigaciones Oncológicas - FUCA; Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires.*

Se presenta una actualización de la evolución de 30 pacientes con melanoma cutáneo estadio III (AJCC), tratados en un Ensayo Clínico de Fase II no randomizado con vacunas heterólogas y cuyos primeros resultados ya fueron publicados (Medicina 57, 421-427, 1997). En dicho estudio, la mediana del tiempo libre de progresión de enfermedad (TLPE) fue de 7.0 meses para el grupo control (n = 24 pacientes) y de 20.0 meses para el grupo tratado (n = 30 pacientes). La evolución de los pacientes fue seguida durante 33 meses más. Las medianas de los TLPE permanecieron idénticas en ambos grupos. De los 30 pacientes tratados, existen aún 9 libres de enfermedad (30 %) con un tiempo de seguimiento mínimo de 47 meses y máximo de 88 meses. Se detectó formación de anticuerpos (Abs) anti-melanoma en 70 % de los pacientes (ELISA, dilución 1/1000). En lo que respecta a recurrencias tardías, se observaron a 49 meses, 51 meses y 65 meses (5 meses después de finalizado el protocolo de vacunación). Por lo menos en 3 pacientes existen evidencias que sugieren desarrollo de metástasis durante el tratamiento con posterior regresión espontánea de las mismas. Estos datos demuestran que: 1) La vacunación con células heterólogas aumenta el TLPE en melanoma estadio III; 2) Se induce formación de Abs en un número significativo de pacientes. Se sugiere que estas vacunas antimelanoma inducen un estado de dormancia celular, y que la vacunación debería prolongarse más allá de los 5 años utilizados en este protocolo.

## REPRODUCCION II

**59. El factor de crecimiento transformante- $\beta$  como modulador autocrino intraovárico.** Guillermo Lanuza, Lino Barañao

*Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; Departamento de Química Biológica, FCEyN, Universidad de Buenos Aires.*

La acción de las gonadotropinas en el desarrollo del folículo ovárico se encuentra modulada por factores peptídicos locales. El objetivo de este trabajo fue determinar si el TGF- $\beta$  califica como

un regulador autocrino del crecimiento de las células de la granulosa. Se determinaron los niveles de TGF- $\beta$  en medios condicionados (MC) por células de la granulosa usando un bioensayo específico en células Mv1Lu; TGF- $\beta$  activo (MC):  $37 \pm 6$ , TGF- $\beta$  total (MC acidificado):  $7 \pm 1$  ng/ml. Asimismo la síntesis *in vivo* se determinó por la presencia de actividad tipo TGF- $\beta$  en el fluido folicular. Los MC ensayados sobre las propias células de la granulosa, estimularon la síntesis de ADN, al igual que preparados de TGF- $\beta$  purificado: TGF- $\beta$  (3ng/ml):  $10.7 \pm 0.4$ , MC (15%):  $3.9 \pm 0.5$ , MC ácido (15%):  $8.1 \pm 1.1$  veces de estimulación. La acción del MC fue revertida por inmunoneutralización con anticuerpos anti-TGF $\beta$  ( $p < 0.01$ ). Los resultados indican que el TGF- $\beta$  califica como regulador autocrino, ya que las células de la granulosa producen, convierten este factor de crecimiento secretado a la forma bioactiva y son sensibles a su acción.

**60. Efecto de Medroxiprogesterona en parámetros reproductivos en la rata.** Alejandra Villavicencio, Ricardo Deis.

*Laboratorio de Reproducción y Lactancia (LARLAC. CRICYT). Mendoza.*

Se estudió la acción de Medroxiprogesterona (2 mg/rata i.m.), un anticonceptivo de amplio uso en humanos, administrada a la rata en proestro (12.00 hs), sobre la secreción de PRL, LH, GH y P4, ovulación, ciclo sexual y capacidad de fecundación. Se observó una menor secreción de PRL (Control:  $190.2 \pm 18.9$ , Medrox:  $19.44 \pm 3.15$ ) y GH (Control:  $12.7 \pm 1.8$ , Medrox:  $6.4 \pm 1.6$ ) asociado con un significativo aumento de LH (Control:  $2.4 \pm 0.2$ , Medrox:  $37.8 \pm 2.91$ ) y P4 (Control:  $17 \pm 2.2$ , Medrox:  $63.45 \pm 4.47$ ). El tratamiento con Medroxiprogesterona no afectó el comportamiento sexual, sin embargo el 66,6% de las ratas con espermatozoides en vagina quedaron preñadas. Se observó una disminución en el número de ovocitos (Control:  $11 \pm 1,2$ ; Medrox:  $7,6 \pm 0,2$ ) y de crías (Control:  $11,37 \pm 0,6$ , Medrox:  $5 \pm 1,1$ ). La duración de la gestación y lactancia fue normal y el ciclo sexual post-lactancia fue regular de 4 días. Un grupo de ratas vírgenes tratadas con Medroxiprogesterona en proestro tuvieron un ciclo de Diestro constante de  $23 \pm 3,3$  días, seguido de ciclos irregulares de  $18,8 \pm 1,8$  días. Los resultados indican una acción anticonceptiva parcial en las ratas tratadas con Medroxiprogesterona y un sorprendente aumento de la secreción de LH con alteración de la ovulación e implantación.

**61. Patrones de fertilización anormal en oocitos humanos.**

Vanessa Rawe, Florencia Nodar, Santiago Brugo Olmedo, Alfredo Vitullo

*Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (Laboratorio de Biología, Investigación y Estudios Especializados), Buenos Aires.*

Un porcentaje bajo de embriones obtenidos por fertilización in vitro (FIV) o inyección intracitoplásmica de espermatozoide (ICSI), desarrollan anormalmente con la formación de 1, 3 ó más pronúcleos. Se estudiaron 113 cigotos clasificados como 'fertilizados anormalmente' entre las 12-18 hs post FIV o ICSI, haciendo hincapié en la organización del citoesqueleto, estado de la cromatina, nivel de ploidía y organización del áster. Se incluyeron cigotos con un pronúcleo (1PN), tres pronúcleos (3PN) cuatro pronúcleos (4PN) o con tres o más subnúcleos ( $^3$ SN), con la presencia de uno o dos cuerpos polares (1CP o 2CP) en cada caso. El material se procesó para inmunofluorescencia con la utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de a y b tubulinas y a tubulinas acetiladas. El material genético se estudió por tinción con Hoechst 33258 y se analizó por microscopía óptica (UV). El patrón de fertilización anormal más frecuentemente detectado luego de FIV fue la presencia de 3 ó 4 PN, (74,61%). Por el contrario, el principal patrón de fertilización anormal luego de ICSI resultó ser la presencia de 1PN (63,02%). Un 4,47% de los cigotos remanentes luego de FIV y un 4,34% luego de ICSI, mostraron desarrollo de subnúcleos. Las anomalías detectadas luego de FIV o ICSI presentaron etiologías variadas, incluyendo partenogones, ginogones, androgones y en proporciones diferentes.

**62. Correlación entre niveles hormonales e Inhibina (Inh) A y B en fluido folicular (FF) de pacientes sometidas a técnicas de fertilización asistida (ART).** Alejandra Vitale<sup>1</sup>, Stella Lancuba<sup>2</sup>, María Ballerini<sup>3</sup>, Stella Campo<sup>3</sup>, Marta Tesone<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, <sup>2</sup> Centro de Investigaciones en Medicina Reproductiva y <sup>3</sup> Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Buenos Aires.

Las Inh A y B gonadales poseen un rol local en la regulación de la foliculogénesis. Nuestro objetivo fue determinar los niveles de Inh A y B en FF de pacientes (n :22) sometidas a ART, correlacionar estos valores con la edad de las pacientes, el nro de ovocitos aspirados, FSH, hCG, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> folicular, y los embarazos logrados. La concentración en FF de Inh A fue mayor que la de Inh B (7.42±1.42 vs 1.24±0.23 ng/mg prot.). Se observó una correlación positiva entre las concentraciones de Inh A y P<sub>4</sub> (r:0.53 p=0.015), E<sub>2</sub> (r: 0.73 p=0.001), FSH (r: 0.53 p=0.015) y hCG (r: 0.59 p=0.005) en FF. También hubo correlación positiva entre los niveles de E<sub>2</sub> y FSH (r:0.61 p=0.004). Los valores de Inh A no se correlacionaron ni con la edad, ni con el N° de ovocitos recuperados. Por otro lado, no hubo correlación entre Inh B vs N° de ovocitos (r:-0.06); P<sub>4</sub> (r:-0.13); E<sub>2</sub> (r:-0.042) o FSH (r:-0.13). 54.5% de las pacientes embarazaron. El grupo de embarazadas (P) vs no embarazadas (NP) mostró diferencias significativas entre: la edad (< en el grupo P), el N° de ovocitos y el N° total de embriones obtenidos (> en el grupo P). No hubo diferencias entre la tasa de fertilización y el N° de embriones transferidos. El promedio de Inh A fue mayor en P con respecto a NP (8.45 ± 2.63 vs 6.41 ± 1.21 ng/mg prot) aunque esta diferencia no fue significativa. Los resultados sugieren que la Inh A del FF es uno de los factores que regulan el óptimo desarrollo folicular.

**63. Análisis molecular del gen de acrosina en pacientes infértiles.** <sup>1</sup>Sara Marí, <sup>2</sup>Vanesa Rawe, <sup>1</sup>Liliana Daín, <sup>1</sup>Mónica Vazquez-Levin.

<sup>1</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental, <sup>2</sup> Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción, Buenos Aires.

Acrosina es una proteasa espermática mayoritaria, miembro de la familia de serina proteasas, con sitio activo en His69/Asp123/Ser221. Anormalidades en su actividad enzimática han sido asociadas a cambios en la secuencia aminoacídica (Shimizu et al., J. Androl., 1997). El presente trabajo se enfocó al estudio bioquímico y molecular de acrosina en 27 pacientes en tratamiento por infertilidad. Para ello, se evaluó la actividad amidasa de acrosina (Kennedy et al., J. Androl. 1989). Asimismo, se determinaron las condiciones óptimas de amplificación por PCR y el patrón de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) de la secuencia nucleotídica del exón 3, codificante del residuo Asp123 del sitio catalítico. El patrón óptimo del exón 3 se evaluó en geles al 8% con glicerol 4° C, 12% sin glicerol 4° C y 12% con glicerol Tamb. En el estudio bioquímico se detectó una actividad enzimática anormal de acrosina (< 17 uU/millón esp.) en 5 de los 27 casos (18.5%). En todos los casos se obtuvo amplificación de la secuencia del exón 3. El patrón de SSCP mostró diferencias en 2 de los casos, en la condición de 8% con glicerol y 4° C, los que correspondieron a muestras de actividad enzimática disminuida. Por primera vez se describe un análisis molecular sobre el gen de acrosina en pacientes infértiles. El estudio revela la presencia de un patrón de ADN en SSCP diferente al observado con muestras de actividad normal en dos muestras con actividad anormal. Estudios de secuenciación permitirán determinar si el cambio en el patrón se asocia a alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen.

**64. Beta-hexosaminidasa en la interacción espermatozoide - zona pelúcida humana.** Patricia Miranda, Fernanda González-Echeverría, Jorge Blaquier, Don Mahuran, Jorge Tezón

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires; Fertilab. The Hospital for Sick Children, Toronto, Canadá

Estudios previos de nuestro laboratorio apoyan la participación de los residuos N-acetilglucosamina en la interacción del espermatozoide humano con la zona pelúcida (ZP) y sugieren la mediación de la Hexosaminidasa (Hex) del espermatozoide en estos eventos. El objetivo del presente trabajo fue analizar la participación de la Hex en la interacción espermatozoide-ZP in vitro. Hex recombinante humana (hrHex) fue expresada en células CHO. El efecto de la hrHex y de un sustrato específico para la Hex en la interacción espermatozoide-ZP fue analizado mediante ensayos de unión a hemizona (HZA). La presencia de hrHex en el HZA disminuyó significativamente el número de espermatozoides unidos por hemizona (HZ), mientras que no se obtuvo efecto con proteínas producidas por células CHO control. Este efecto pudo reproducirse al pre-incubar a las HZ con la hrHex (40±12 vs. 21±7 espermatozoides/HZ, p<0.004) y no al pre-incubar a los espermatozoides con la enzima. La presencia de un sustrato específico para la Hex (4-methyl-umbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide) durante el HZA disminuyó el número de espermatozoides unidos a la HZ (31±7 vs. 20±3 espermatozoides/HZ, p<0.03). Estos resultados sugieren la participación de la Hex en la interacción espermatozoide-ZP humana.

## CARDIOLOGIA II

**65. Cardioprotección mediada por canales de potasio dependientes de ATP contra la disfunción contráctil sistólica postisquémica en ovejas conscientes.** Héctor del Valle, Jorge Negroni, Elena Lascano, Alberto Crottogini  
Universidad Favaloro. Buenos Aires.

La evolución de la disfunción contráctil postisquémica, atonamiento (At), se ha estudiado siempre en términos de recuperación de la función ventricular eyectiva, medida ésta como presión desarrollada, recuperación del espesamiento o del acortamiento del segmento. Por otra parte los canales de potasio dependientes de ATP (CKATP) han demostrado cardioprotección contra el At sistólico consecutivo a una isquemia reversible. Sin embargo, en animales conscientes, existe escasa experiencia acerca de la protección que pueden tener los CKATP en la fase diastólica del ciclo ventricular. Este trabajo evaluó el rol de los CKATP en la recuperación de la mecánica ventricular sistólica y diastólica durante la reperfusión en animales conscientes sometidos a 12 minutos de isquemia. Se estudiaron 13 ovejas, 8 en condiciones control (C) y 5 tratadas con un bloqueante de los CKATP, Glibenclamida (Gli) 0.4 mg/Kg. Durante la reperfusión (R) se midió: recuperación del espesamiento parietal sistólico [ES] en porcentajes con respecto al basal considerado 100%, trabajo latido regional [TLR] y complianza radial al final de la diástole [CRD]. Resultados expresados como promedio total de la R:

	ES (X±SD)	TLR (X±SD)	CRD (X±SD)
C	62,4 ± 10,7	49,17 ± 19,5	103,5 ± 13,4
Gli	17,84 ± 23 ‡	3,96 ± 19,6 †	77,87 ± 25 *

Test de t, Gli versus C. \* p < 0.05, † p < 0.01 y ‡ p < 0.001

Conclusiones: Los CKATP participan en la recuperación de la función contráctil postisquémica tanto sistólica como diastólica en animales conscientes.

**66. Efectos del precondicionamiento isquémico en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).** Susana Mosca, Horacio Cingolani.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata.

El precondicionamiento isquémico (PI) atenúa las alteraciones postisquémicas. Para analizar los efectos del PI en ratas es-

pontáneamente hipertensas (SHR), realizamos experimentos en corazones aislados de ratas WKY y SHR. Se realizaron dos protocolos: I: 20 min de isquemia global (Is) y 30 min de reperfusión (R) y II (PI): antes de la Is de 20 min se sometieron a un ciclo de Is/R de 5 y 10 min respectivamente. La contractilidad se evaluó a través de la presión desarrollada (PD) y la contractura a través de la presión diastólica final (PDF). Se midió además el tiempo de comienzo de la contractura isquémica (to). El PI aumentó significativamente la recuperación postisquémica, siendo la PD al final de la R,  $91 \pm 11\%$  y  $86 \pm 11\%$  para WKY y SHR, respectivamente vs  $43 \pm 12\%$  y  $48 \pm 11\%$  en corazones no PI. La contractura isquémica y el to de ambas cepas no fueron modificados por el PI. Sin embargo, el PI disminuyó significativamente la contractura durante la R (a los 30 min de R la PDF fue  $25 \pm 6$  y  $19 \pm 6$  mmHg vs  $55 \pm 20$  y  $43 \pm 9$  mmHg en WKY y SHR respectivamente, en corazones no PI). Estos resultados demuestran que, a pesar de la hipertrofia ventricular, el PI protege de manera similar a las ratas normotensas y SHR frente a las alteraciones sistólicas y diastólicas que siguen a la isquemia-reperfusión.

**67. Efectos del acondicionamiento hipóxico sobre la liberación de lactato y el contenido de CoA y de acilCoA en bandas de ventrículo derecho de rata sometidas a hipoxia-reoxigenación.** Gustavo Testoni, Silvana Cerruti, Paula Kade, Alicia Varela, Enrique Savino.

*Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CONICET.*

En bandas de ventrículo derecho (V) de rata la hipoxia produce caída de la fuerza y desarrollo de contractura. El ayuno previo, que activa el catabolismo lipídico produciendo inhibición de la actividad glucolítica y acumulación tóxica de metabolitos de los ácidos grasos, exacerba los daños. El acondicionamiento hipóxico (PC) atenúa esta exacerbación. El objetivo de la investigación fue establecer si los efectos beneficiosos del PC se acompañan de cambios en la liberación de lactato y en la acumulación de metabolitos de los ácidos grasos, especialmente acilCoA. Con esta finalidad se midió el lactato liberado al medio y el contenido tisular de acilCoA y de CoA libre en V de ratas alimentadas (AL) o ayunadas 24 h (AY), montadas isométricamente en Krebs-bicarbonato con glucosa 10 mM, estimuladas a 1 Hz. El PC consistió en aplicar luego de 90 min de equilibrio, 5 min de hipoxia y 10 min de reoxigenación seguidos de 30 min de hipoxia. Los acilCoA se extrajeron según Williamson y Corkey y después de hidrolizar se midió CoA por método UV. El lactato se midió por el método de Hohorst. La estadística se hizo con ANOVA de 2 factores. Al finalizar la hipoxia, el contenido de acilCoA fue mayor en AY controles con respecto a AL ( $23,42 \pm 2,10$  vs  $15,30 \pm 1,56$  nmol/gh  $P < 0,05$ ) y la liberación de lactato menor ( $6,21 \pm 0,18$  vs  $7,64 \pm 0,83$  mmol/100mgh  $P < 0,05$ ). El contenido de CoA libre fue igual en ambos grupos ( $43,37 \pm 4,14$  vs  $42,21 \pm 7,89$  nmol/gh). El PC aumentó la liberación de lactato en AY ( $7,76 \pm 0,53$  mmol/100mgh  $P < 0,05$ ) y no modificó los contenidos de acilCoA y de CoA libre en ningún grupo. Los resultados sugieren que los efectos beneficiosos del PC sobre la función contractil en ventrículos AY no se deben a una menor acumulación de catabolitos de ácidos grasos pero podrían ser consecuencia de la activación de la glucólisis.

**68. Contractilidad vascular en etapa crónica de hipertensión por fructosa en la rata.** Pablo Damiano\*, Inés Rosón\*, Liliana Albornoz\*, Ana Puyó\*\*, Susana Cavallero\*\*, Eduardo Dascal\*, Luis Cuniberti\*, Belisario Fernández\*\*, Ignacio de la Riva\*

*\*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina; #Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutierrez; \*Fundación Favaloro, \*\*Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Una dieta rica en fructosa provoca en la rata hipertensión arterial y alteraciones metabólicas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la reactividad vascular en relación a dichas alteraciones.

Se estudiaron ratas Sprague-Dawley, machos (180g), durante 22 semanas divididos en 2 grupos: C: control (n=12) y F: (n=12), solución de fructosa al 10% como bebida. Se registró la presión arterial indirecta. Se estudió el tono basal y la respuesta vascular a distintos agonistas. Se observó en el grupo F un aumento de: presión arterial (mmHg,  $138 \pm 5$  vs C:  $113 \pm 4$ ,  $p < 0,01$ ), glucemia (mg%,  $150 \pm 4$  vs C:  $127 \pm 5$ ,  $p < 0,001$ ), trigliceridemia (mg%,  $246 \pm 38$  vs C:  $115 \pm 17$ ,  $p < 0,01$ ), ANP (ng/ml,  $193 \pm 33$  vs C:  $109 \pm 17$ ,  $p < 0,05$ ) y peso corporal (g,  $708 \pm 33$  vs C:  $605 \pm 13$ ,  $p < 0,02$ ) sin cambios en la insulinemia. La aorta torácica no mostró cambios en el tono basal, contracción al 12,13-forbol dibutirato (PDBu) y fenilefrina (PE), ni en la relajación a la insulina. La respuesta a la PE en presencia de Calphostin C fue mayor en el grupo F ( $47 \pm 8\%$  vs C:  $76 \pm 10\%$ ,  $p < 0,05$ ) y esta diferencia desapareció por efecto del NAME. En el grupo F la producción basal de óxido nítrico (ON) evaluada con NAME sobre la contracción a la PE correlacionó positivamente con los triglicéridos plasmáticos ( $r = 0,89$ ,  $r^2 = 0,79$ ,  $p < 0,02$ ,  $n = 6$ ) y con el peso ( $r = 0,85$ ,  $r^2 = 0,72$ ,  $p < 0,03$ ). Conclusión: la menor contracción a la PE en presencia de Calphostin en el grupo F sugiere una mayor participación de la proteína quinasa C en la contracción vascular; la reversión con NAME demuestra un efecto compensatorio del ON, lo que también explicaría la ausencia de diferencias en la sensibilidad al PDBu y a la PE. Esta mayor contribución del ON podría deberse al incremento en el ANP y estaría relacionada con el nivel de triglicéridos plasmáticos y el peso corporal.

**69. Regresión de la hipertrofia nuclear miocítica después del soporte mecánico del ventrículo izquierdo.** Hernán García Rivello, Patricia Cabeza Meckert, Carlos Vígliano, Roberto Favaloro, Luis Palacios, Rubén Laguens.

*ICyCC Fundación Favaloro, CIC Buenos Aires, UN La Plata, CONICET Buenos Aires.*

El empleo del dispositivo de asistencia ventricular izquierda (DAVI) produce una remodelación "inversa" del corazón con reducción de la dilatación, masa y tamaño miocítico del ventrículo izquierdo (VI). En el presente estudio se investigó si la regresión de la hipertrofia celular se acompaña de modificaciones nucleares en 2 pacientes que recibieron un DAVI (Novacor) como puente al trasplante cardíaco durante un año (pte 1) y 74 días (pte 2). Se obtuvieron muestras del VI en el momento del implante del DAVI y del explante cardíaco. Las muestras se procesaron para estudio inmunohistoquímico para ciclina D1, PCNA, proteína Rb y determinación de ploidía nuclear por citomorfometría (expresado en %).

Paciente	Ciclina D1	PCNA	Rb	2c	4c	8c	>8c
1 pre DAVI	0	95	60	16.13	19.35	53.2	11.3
1 post DAVI	0	2	5	58.95	23.16	14.7	2.1
2 pre DAVI	20	90	50	55.45	41.58	2.9	0
2 post DAVI	2	45	30	79	17	3	0

Los resultados expuestos muestran que la implantación durante un tiempo prolongado de un DAVI disminuye el número de miocitos tetraploides e hipertetraploides y de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular. El incremento del número de miocitos diploides sugiere la existencia de divisiones nucleares.

**70. Correlación entre la actividad PCNA y grado de ploidía del núcleo miocítico con la evolución de la miocardiopatía dilatada.** Patricia Cabeza Meckert, Carlos Vígliano, Alejandra Camino, Luis Palacios, Rubén Laguens

*Universidad Favaloro, ICyCC, Buenos Aires; Universidad Nacional de La Plata.*

La miocardiopatía dilatada (MCD) es una enfermedad de alta mortalidad y la indicación más frecuente de trasplante cardíaco. En el momento actual no existen parámetros morfológicos predictores de la evolución de esos pacientes. En el presente estudio se correlaciona el grado de ploidía y la actividad PCNA (pro-

teína relacionada con el ciclo celular) con la mortalidad o la realización del trasplante en 41 pacientes con MCD en los que se realizó biopsia endomiocárdica. En las mismas se determinó el grado de ploidía de los núcleos mitóticos por citomorfometría y la actividad PCNA por inmunohistoquímica. La mejor evolución clínica (ausencia de muerte o trasplante) se asoció con los núcleos diploides ( $p=0.02$ , prueba *t* de Student) y con la actividad de PCNA definida como ausencia o presencia de núcleos positivos ( $p=0.04$ , prueba  $\chi^2$ ). Estos resultados indican que la ausencia de poliploidización y la posibilidad de replicar el ADN pueden ser predictores de mejor evolución en los pacientes con MCD.

### ENDOCRINOLOGIA III

#### 71. Efecto de la activación GABAérgica sobre la liberación de LHRH, glutamato (GLU) y taurina (TAU) por parte de fragmentos hipotalámicos de ratas peripuberales. Carlos Feleder, Wolfgang Wuttke\*, Jaime Moguilevsky, Pablo Arias.

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, y \*Frauenklinik, Uni-Göttingen, Alemania*

**Objetivos:** evaluar el efecto del sistema GABAérgico sobre 1) la liberación de LHRH en ratas Wistar hembra de 30 días de edad, y 2) los cambios asociados en el output hipotalámico de dos neurotransmisores aminoacídicos (AANT): GLU y TAU. **Métodos:** utilizamos en primer lugar la activación *in vivo* del sistema GABAérgico (AOAA o ácido aminooxicacético 10 mg/kg i.p. 60 min antes del sacrificio) midiendo la liberación de LHRH, GABA, GLU y TAU por parte de fragmentos de hipotálamo mediobasal y anterior (AMBH) en perfusión; en una segunda serie de experimentos agregamos muscimol o baclofen (1  $\mu$ M) a fragmentos igualmente preparados. En todos los casos se realizaron experimentos control en paralelo. Medimos LHRH por radioinmunoensayo, y GABA, GLU y TAU por HPLC-UV y derivatización precolumna. Para el análisis estadístico se empleó el test de Wilcoxon para datos no apareados. **Resultados:** tanto el aumento de GABA endógeno inducido por AOAA *in vivo*, como el estímulo *in vitro* con agonistas GABA-A y GABA-B resultaron en una disminución significativa ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  y  $p < 0.05$  vs. controles, respectivamente) de la secreción de LHRH. Paralelamente se observó una disminución de los niveles de GLU y un incremento del output de TAU ( $p < 0.05$  vs. controles). **Comentarios:** nuestros resultados destacan el efecto inhibitorio del sistema GABAérgico sobre la liberación de LHRH en ratas hembra peripuberales, mediado tanto por receptores GABA-A como GABA-B; además, la manipulación farmacológica *in vivo* e *in vitro* del sistema GABAérgico hipotalámico induce cambios significativos en la liberación de GLU y TAU, lo que permite postular la existencia, en esta etapa del desarrollo puberal, de mecanismos de "cross-talk" entre los AANT excitatorios e inhibitorios que regulan la secreción de LHRH.

#### 72. Participación de subtipos de receptores opioides en la regulación de la secreción de PRL en preñez. Marta Soaje, Ricardo Deis

*Laboratorio de Reproducción y Lactancia. LARLAC-CONICET. Mendoza.*

Previamente se demostró que el Sistema Opiode (S.O) estimula la secreción de PRL en la primera mitad de la preñez y la inhibe al final. Antagonistas y agonistas específicos de los receptores opioides se administraron *in vivo* los días 3 y 19 de preñez, en animales previamente cañulados en el ventrículo lateral. Los agonistas DAMGO ( $\mu$ ) y  $\beta$ -END 5  $\mu$ g/rata, DPDPE ( $\delta$ ) y U-50,488 ( $\kappa$ ) 20  $\mu$ g/rata fueron inyectados 15 min antes de la decapitación (18.00 h). Los antagonistas naloxonazina ( $\mu_1$ ), nor-BNI ( $\kappa$ ) y naltrindole ( $\delta$ ) en dosis de 5  $\mu$ g/rata fueron inyectados 30 min antes del sacrificio. En el día 3, DAMGO y  $\beta$ -END aumentaron la secreción de PRL (V: 46.30  $\pm$  14.78 ng/ml; DAMGO: 206.31  $\pm$  43.70 ng/ml;  $\beta$ -END: 204.85  $\pm$  66.21 ng/ml). No se observó efecto con los agonistas  $\kappa$  y  $\delta$ . Los tres antagonistas bloquearon la secre-

ción de PRL. En el día 19 de preñez, las ratas se trataron con el antiprogesterona Mifepristone (10 mg/kg, s.c) a las 08.00 h para facilitar la secreción de PRL y se determinó el tipo de receptor responsable de la acción inhibitoria del S.O en el día 19 sobre la secreción de PRL. Nor-BNI ( $\kappa$ ) aumentó la secreción de PRL pero fue menos efectiva que naloxonazina (V: 7.33  $\pm$  1.00 ng/ml; Nor-BNI: 16.06  $\pm$  4.62 ng/ml); naloxonazina: 75.23  $\pm$  20.90 ng/ml). Naltrindole ( $\delta$ ) no tuvo efecto. Los resultados indicarían que el receptor opioide  $\mu$  (posiblemente  $\mu_1$ ) estaría involucrado en la acción estimuladora (día 3) e inhibitoria (día 19) de la secreción de PRL. No existiría especificidad de los antagonistas opioides usados en el día 3 de preñez. En el día 19, el receptor  $\delta$  no participaría en la regulación de la secreción de PRL, mientras que el receptor  $\kappa$ , sería menos efectivo que el receptor  $\mu$ .

#### 73. Regulación de Nur77 en células AtT20 por CRH, IL-1 y AMPc: Mecanismos moleculares en la regulación de POMC. Damián Kovalovsky<sup>1</sup>, Marcelo Paez Pereda<sup>2</sup>, Gunter K. Stalla<sup>2</sup>, Florian Holsboer<sup>2</sup>, Eduardo Arzt<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM), Dpto de Biología, FECEN, UBA y CONICET.* <sup>2</sup> *Max-Planck Institute, Munich, Alemania.*

La función hipofisaria está regulada por factores hipotalámicos y por citoquinas provenientes del sistema inmune y de la misma hipófisis, que actúan en forma autócrina y parácrina. Recientemente se ha demostrado que el principal mediador de la acción estimuladora de CRH (hormona liberadora de corticotrofina) sobre el gen de POMC (proopiomelanocortina) es un factor de transcripción llamado Nur77. Utilizamos una línea celular corticotrófica de ratón (AtT20) y analizamos el RNA mensajero de Nur77, y su actividad transcripcional mediante tranfección con un plásmido reporter que contiene el elemento respondedor a Nur acoplado al gen de la luciferasa (NurRE-LUC). Observamos que CRH estimula al RNA mensajero y la actividad transcripcional de Nur77 20 veces ( $p < 0.001$ ), IL-1 estimula al doble ( $p < 0.01$ ), y CPT-AMPC estimula 38 veces ( $p < 0.001$ ). El tratamiento con Nifedipina (un antagonista de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L) bloquea completamente la activación de NurRE-LUC y al RNA mensajero de Nur77 por CRH e IL-1 pero solo en un 50% ( $p < 0.001$ ) la activación por AMPc. Además el tratamiento con agente despolarizante como KCl (36mM) más un agonista de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L estimula al RNAm y la actividad transcripcional 150 veces ( $p < 0.001$ ). El tratamiento con un vector de expresión que sobreexpresa un CREB mutado (que no se fosforila y actúa entonces como un bloqueante de la vía CREB) produce una inhibición parcial del 33% ( $p < 0.001$ ) sobre la estimulación por CRH, y no bloquea a la de IL-1. Mostramos que no solo CRH sino también otro importante inductor de POMC, como IL-1, estimulan Nur77. A pesar de que factores relacionados a CRE están involucrados en la inducción de Nur77 por CRH, estos, al igual que para la IL-1, son estrictamente dependientes del  $Ca^{2+}$ , mientras que AMPc además de actuar por la entrada de  $Ca^{2+}$  estimula Nur77 independientemente del  $Ca^{2+}$ .

#### 74. La estructura tridimensional y las células foliculo estrelladas son fundamentales en la regulación de la función hipofisaria por las citoquinas gp 130: IL-11 y CNTF. Carolina Perez Castro<sup>1</sup>, Alberto Carbia<sup>1</sup>, Marcelo Paez Pereda<sup>2</sup>, Ulrich Renner<sup>2</sup>, Günter Stalla<sup>2</sup>, Eduardo Arzt<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM), Depto. de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA;* <sup>2</sup> *Max Planck Institute, Alemania.*

Hemos reportado que células lactosomatotróficas, GH3, expresan el mRNA del receptor de *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) y que el CNTF estimula la secreción PRL y GH. En células foliculo estrelladas (FS), TTT/GF, que expresan el mRNA del receptor IL-11, esta citoquina estimula la proliferación y secreción de VEGF. El objetivo de este trabajo fue analizar la respuesta a IL-11 (200 U/ml) y CNTF (50 ng/ml) de células normales de la pituitaria anterior, y si ésta es dependiente de la estructura espacial asociada con la comunicación celular dentro de la glándula. En cultivos

en agregados (estructuras tridimensionales celulares) ambas citoquinas estimulan la secreción (RIA) de GH (IL-11: 224.7%,  $p < 0.001$ ; CNTF: 189.26%,  $p < 0.001$ ) y PRL (IL-11: 143.96%,  $p < 0.001$ ; CNTF: 124.7%,  $p < 0.05$ ); a diferencia de lo ocurrido en cultivos en monocapas (células dispersadas en monocapa por colagenasa) donde IL-11 y CNTF estimulan la secreción de GH (IL-11: 120.13%,  $p < 0.05$ ; CNTF: 115.14%,  $p < 0.01$ ), sin modificar la secreción de PRL. También observamos que, en células GH3, IL-11 regula la secreción hormonal (PRL y GH), y que células TTT/GF poseen CNTF-R (Northern blot 2kb) y CNTF estimula la proliferación (ELISA para actividad de deshidrogenasas mitocondriales) (157.5%,  $p < 0.001$ ). Ambas líneas celulares expresan el mRNA CNTF (1.2 Kb). IL-11 como CNTF actúan como factores reguladores del crecimiento y la función de las células de la pituitaria anterior. La capacidad de establecer una comunicación auto/paracrina, donde las células FS juegan un rol esencial, es crítica para la regulación de la función de la pituitaria anterior por estas citoquinas.

#### 75. Interacción de los sistemas glutamatérgico/NMDA y dopaminérgico incerto-hipotalámico en el control de la liberación de LH. Claudia Bregonzio, Ricardo Cabrera

Laboratorio de Investigaciones Cerebrales, CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Mendoza.

Existen numerosas evidencias sobre la participación del sistema glutamatérgico en la liberación de la hormona luteinizante (LH). Se sabe que el sistema dopaminérgico incertohipotalámico regula positivamente la secreción de LH, mientras que no se conoce la participación del sistema glutamatérgico en el control de LH a este nivel. El objetivo de este trabajo fue estudiar la interacción de ambos sistemas a nivel de la Zona Incerta medial anterior (ZIm) en el control de la secreción de LH en ratas bajo diferentes condiciones hormonales. Se utilizaron ratas hembras las que fueron ovariectomizadas y canuladas bilateralmente en ZIm. El esquema de impregnación estrogénica (E 25 ug/rata) fue: A) 24 y 48 hs previo al experimento. B) 48 hs previo al experimento. En el día del experimento se inyectó Progesterona (P 1 mg/rata) para ambos modelos (E y P se administraron s.c a las 9 hs) y se les colocó una cánula en la vena yugular. A las 15 hs se les inyectó: salina, AP-7 (100 nmoles.), Dopamina (DA) (2 ó 6 ug) ó AP-7 +DA. El volumen final de inyección se ajustó a 1 ul. Se tomaron muestras de sangre cada 1 hora desde las 16 hasta las 22 hs inclusive. Además, se midió el contenido de DA y su metabolito DOPAC por HPLC en distintas regiones hipotalámicas luego de la inyección de salina o AP-7 en ZIm. Los datos se analizaron con Anova 1 y Dunnet post test, o test de *t*. El modelo B estimuló la descarga de LH la cual fue inhibida por AP-7 y DA 2  $\mu$ g (2117  $\pm$  403 vs 171  $\pm$  43 y 182  $\pm$  33) ( $p < 0.01$ ). DA 6  $\mu$ g revirtió la inhibición inducida por AP-7. El modelo A produjo una liberación de LH baja y constante; la administración de ambas dosis de DA estimularon la secreción de LH (114  $\pm$  25 vs. 633  $\pm$  102 y 3598  $\pm$  16) ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) la cual fue inhibida por la administración previa de AP-7. La administración de AP-7 disminuyó el índice de recambio (DOPAC/DA) en HMB 0.42  $\pm$  0.11 vs. 0.19  $\pm$  0.03 ( $p < 0.05$ ) a las 16 hs y lo aumentó a las 19 hs en MPO 0.13  $\pm$  0.01 vs. 0.42  $\pm$  0.1 ( $p < 0.001$ ). Concluimos que el sistema glutamatérgico/NMDA en ZIm ejerce un claro control de la secreción de LH. Este control involucraría una interacción con el sistema dopaminérgico a este nivel el que depende a su vez del ambiente dado por las hormonas ováricas.

#### 76. La dihidrotestosterona (DHT) antagoniza el desarrollo de tumores hipofisarios inducidos por dietilestilbestrol (DES) en ratas F344. Gerardo Piroli<sup>1,2</sup>, Luciana Pietranera<sup>1</sup>, Claudia Grillo<sup>1,2</sup>, Mónica Ferrini<sup>1</sup>, Victoria Lux-Lantos<sup>1</sup>, Alejandro De Nicola<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental; <sup>2</sup> Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Para estudiar el efecto del andrógeno no aromatizable DHT sobre el desarrollo de prolactinomas inducidos por DES empleamos

hembras F344 ovariectomizadas que se separaron en (1) controles (C), (2) DES (que recibieron pellets de 20 mg de DES), y (3) DES-DHT (que recibieron el pellet de DES y otro de 12 mg de DHT 14 días después). A los 40 días de iniciado el tratamiento, los pesos hipofisarios de los C (12.6 $\pm$ 0.3 mg) se incrementaron por DES (96.8  $\pm$  5.4,  $p < 0.001$ ), mientras que en el grupo DES-DHT hubo reversión parcial (36.8  $\pm$  2.7,  $p < 0.001$  vs DES y C). La prolactina sérica (PRL) siguió un patrón similar: C, 1.6  $\pm$  0.3 ng/ml, DES: 2585  $\pm$  463 ( $p < 0.001$ ) y DES-DHT: 726  $\pm$  58 ( $p < 0.05$  o menor vs. DES y C). La expresión del ARNm del neuropéptido galanina, un marcador de acción estrogénica, determinada por hibridación *in situ* también aumentó por DES y esta estimulación disminuyó por efecto del andrógeno. La muy baja señal de C, contrasta con la estimulación por DES: 194.69  $\pm$  4.94 unidades arbitrarias ( $p < 0.05$ ) que fue atenuada en DES-DHT: 131.74 $\pm$ 14.16 u.a. ( $p < 0.05$  vs. DES). Conclusiones: la inducción estrogénica de un prolactinoma experimental es antagonizada por un andrógeno no aromatizable. Esto se demostró a nivel de peso tumoral, secreción hormonal y expresión genética de un neuropéptido hormono-dependiente.

### TUMORES III

#### 77. Caracterización de las propiedades adhesivas, proteolíticas y migratorias de dos líneas emparentadas de adenocarcinoma mamario murino. Hernán Farina, Daniel Alonso, Claudia Lanari, Daniel Gómez

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes e Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

A partir de un adenocarcinoma mamario murino inducido por acetato de medroxiprogesterona (MPA), mantenido por trans-plantas singéneos en hembras BALB/c tratadas con MPA, se obtuvieron distintas líneas celulares de estirpe epitelial, tumorigénicas, que expresan receptores de estrógenos y progesterona. Se caracterizaron *in vitro* los atributos biológicos determinantes de la invasión tumoral de una línea pobremente agresiva (A-) de morfología epitelioide y otra altamente agresiva (A+) de morfología fibroblastoide, obtenidas del mismo cultivo primario. La cinética de adhesión se cuantificó a los 15, 30 y 60 min después de la siembra de suspensiones celulares. La actividad proteolítica secretada por cultivos tumorales se ensayó en zimografías en geles copolimerizados con gelatina. La migración se cuantificó mediante ensayos de "herida" sobre monocapas confluentes. La línea más agresiva A+ resultó más adherente al sustrato a los 60 min (A-: 6 $\pm$ 5 vs. A+: 46  $\pm$  16 células por campo;  $p < 0.001$ ). La línea A+ secretó altos niveles de gelatinasas de 105 kDa (MMP-9) y 70 kDa (MMP-2) y su capacidad migratoria fue dramáticamente mayor (A-: 25  $\pm$  8 vs. A+: 195 $\pm$ 27 células por campo;  $p < 0.001$ ). Los atributos adhesivos, proteolíticos y migratorios se correlacionarían con la agresividad *in vivo* de las líneas estudiadas.

#### 78. Obtención de una línea celular a partir de un linfoma T murino. Glenda Ernst, Eloisi Caldas Lopes, Paula Cabrera, Mariano Sanchez Lockhart, Elida Alvarez, Silvia Hajos.

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, CONICET, Universidad de Buenos Aires.

El objetivo de este trabajo fue establecer una línea celular a partir de un linfoma T murino de origen espontáneo. Se obtuvo la línea LT-LBL que ya lleva más de 100 pasajes en cultivo, con un tiempo de duplicación determinado por TTT de 24 hs. Está constituida por dos subpoblaciones que difieren en sus características de crecimiento: LT-LBLg que crece formando grumos en suspensión, y LT-LBLp que lo hace adherida al frasco de cultivo sin agruparse. Por análisis histopatológicos pudimos demostrar que el tumor original además de la infiltración previamente descrita en ganglios, hígado y bazo, lo hace también en M.O, pulmón y timo, a diferencia de la línea que invade hígado, bazo, ganglios y timo. Las curvas de muerte mostraron un tiempo de sobrevida mayor para los animales inoculados con la línea (20  $\pm$  2 días) que

para los animales inoculados con el tumor original ( $10 \pm 2$  días), esto podría correlacionarse con una menor y más lenta infiltración. Todas las células tumorales analizadas expresan la molécula de adhesión CD44 aunque las LT-LBLp lo hacen con mayor intensidad, hecho demostrado por citometría de flujo y por RT-PCR. La línea fue susceptible a la inducción de apoptosis por CsA ( $0,1 \mu\text{g/ml}$ ) confirmado por análisis de fragmentación internucleosomal de DNA. En conclusión se ha obtenido una línea celular menos agresiva que el tumor original, que expresa la molécula de adhesión CD44, que estaría relacionada con su capacidad invasiva y que es susceptible a la inducción de apoptosis por drogas inmunosupresoras, proporcionando un modelo para el estudio de mecanismos asociados con la tumorigenicidad.

**79. Influencia directa de los mastocitos en los procesos invasivos tumorales.** Lilia Lauria de Cidre, Florencia Rosignoli, Gabriel Bertolesi, Fabián Crespo y Lydia Puricelli

*Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires,*

Las células tumorales (CT) están moduladas directa e indirectamente por las células estromales, incluyendo los mastocitos (MC). Examinamos su influencia directa sobre el potencial invasivo, migratorio y de adhesión de un adenocarcinoma mamario murino M3, y de la línea derivada por subcultivo secuencial, LM3, con mayor capacidad de invasión local y de generación de metástasis espontáneas. Los experimentos de migración e invasión de las CT se realizaron en cámaras Transwell y se modularon con MC de cavidad peritoneal de ratones singeneicos; los de adhesión a plástico se modularon con los medios condicionados de MC (MCoMC) obtenidos por estimulación con el ionóforo de  $\text{Ca}^{++}$  A23187 ( $0,1 \mu\text{M}$ ), y se cuantificó por dosaje de ADN. El MCoMC incrementó la adhesión de las CT respecto del medio control en  $196 \pm 7,26\%$  en el tumor primario y  $194,44 \pm 9,35\%$  en la LM3, ( $p < 0.001$ ). Los MC inhibieron la migración del M3 y LM3 en  $18,30 \pm 1,04\%$  y  $22,48 \pm 3,51\%$  ( $p < 0.01$ ) respecto del control, respectivamente y solamente la invasión en la LM3, en un  $53,23 \pm 5,92\%$  ( $p < 0.05$ ). Puede concluirse que los MC podrían tener ingerencia directa en la modulación del proceso metastásico, aumentando la adhesión congruentemente con la disminución de la capacidad migratoria de las CT. En la LM3 potenciaron su capacidad invasiva favoreciendo la progresión tumoral. Es decir, el rol de los MC estaría condicionado al tipo celular en conjunción con los microambientes particulares de cada tumor.

**80. Citogenética de un linfoma T murino y de una línea celular obtenida a partir del mismo.** Victoria Fabris, Glenda Ernst, Silvia Hajos, Susana Merani

*Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina; Instituto de Estudios de Inmunidad Humoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Se estudió citogenéticamente un linfoma T murino de origen espontáneo en la cepa BALB/c y una línea celular establecida a partir del mismo. Luego de más de 100 pasajes en cultivo se obtuvieron dos subpoblaciones diferentes en su forma de crecimiento. Se realizaron técnicas convencionales de bandeado cromosómico G y C en el tumor original, en 2 pasajes de la línea y en ambas subpoblaciones. En todas las células estudiadas se encontró un  $2n=40$  con un rango de 35 a 42 cromosomas, todos acrocéntricos. El análisis de las metafases con bandeado G mostró alteraciones numéricas respecto al cariotipo normal para ratón. Las metafases del tumor presentaron monosomías de los cromosomas 5, 13 y 16 y trisomías de los cromosomas 3, 14 y 17. El 90% de las metafases analizadas de la línea celular y de ambas subpoblaciones presentaron una trisomía del cromosoma 14 y la pérdida de un cromosoma sexual como alteraciones del cariotipo. Se puede concluir que la trisomía del cromosoma 14 es una alteración persistente tanto en el tumor como en la línea celular. El tumor original presentó una mayor variabilidad de las alteraciones cromosómicas con un rango de dispersión alto. La línea y las

dos subpoblaciones no presentaron características cromosómicas que permitan diferenciarlas entre sí, por lo cual su capacidad de adhesión y crecimiento no estaría mediada por diferencias evidenciables en el cariotipo.

**81. Interacción entre los caminos de transducción de señales Heregulina (HRG), ligando de la familia de receptores con actividad de tirosina quinasa (RTKs) tipo I y el receptor de progesterona (PR) en el crecimiento de células progestágeno dependientes (HD) de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA).** Leticia Labriola, Eduardo Charreau, Patricia Elizalde

*Instituto de Biología y Medicina Experimental. CONICET. Buenos Aires.*

Demostramos previamente que HRG, ligando de la familia de receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I, estimulaba la proliferación de células epiteliales HD de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA y potenciaba el efecto proliferativo del MPA en esas células. Investigamos ahora una posible activación del PR por HRG. Ensayos de western blot mostraron que el tratamiento con HRG ( $20\text{ng/ml}$ , 2h) de células HD indujo la "down-regulation" de las isoformas A y B del PR. Ensayos radio ligando-receptor corroboraron una significativa disminución ( $p < 0.01$ ) del número de PR (fmol/mg de proteína) inducida por HRG (control:  $1424 \pm 355,8$ , MPA:  $350,3 \pm 62,5$ , HRG:  $520 \pm 80,6$ ). HRG causó un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) en el porcentaje de PR localizado en el núcleo (control:  $6,7\% \pm 7,7$ , MPA:  $92,7\% \pm 3,2$ , HRG:  $54,9\% \pm 2,2$ ). Mediante ensayos de "DNA mobility shift" demostramos que la HRG es capaz de inducir la unión del PR a un elemento respondedor a progesterona (PRE). Nuestros resultados indican que un mecanismo involucrado en el efecto proliferativo de HRG es la activación del PR.

## NEUROCIENCIAS II

**82. Sensibilidad de las Imágenes por Resonancia Magnética en pacientes con epilepsia.** Consalvo Damián, Nano Gabriela, Bohorquez Morera Natalia, Silva Walter, Oddo Silvia, Giagante Brenda, Saidón Patricia, Kochen Silvia, Sica Roberto

*Unidad Asociada al CONICET. Centro Municipal de Epilepsia. Hospital Ramos Mejía. Buenos Aires.*

El método anatómico de elección para detectar lesiones epileptógenas son las imágenes por resonancia magnética (IRM). Se determinó su sensibilidad en relación con la hipótesis topográfica de la epilepsia, establecida sobre la base de la clínica y EEG. Se analizaron, retrospectivamente, de 400 historias clínicas de pacientes que contaron con IRM, la semiología ictal, EEG, tiempo de evolución (TE) de la epilepsia y respuesta al tratamiento. Se clasificaron en: A) Epilepsia Temporal, B) Frontal, C) Parieto-occipital y D) Generalizada. Se incluyeron 184 pacientes: A) 68 casos (37%), 28 hombres (41.1%), edad promedio  $32 \pm 11,2$  años, TE  $20 \pm 12,2$  años, IRM patológicas en 44 (64.7%), refractarios 48 (70.5%). B) 68 casos (37%), 38 hombres (55.8%), edad promedio  $30 \pm 14,7$  años, TE  $15 \pm 11,1$  años, IRM anormales en 26 (38.2%), refractarios 30 (44.1%). C) 19 casos (10.3%), 13 hombres (68.4%), edad promedio  $27 \pm 11,1$  años, TE  $12 \pm 9,5$  años, IRM anormales en 11 (57.8%), refractarios 12 (63.1%). D) 29 casos (15.7%), 15 hombres (51.7%), edad promedio  $29 \pm 14,4$  años, TE  $12,2 \pm 13,3$  años, IRM patológicas en 2 (6,9%), refractarios 5 (17.2%). La sensibilidad del método es alta en sólo un determinado grupo de pacientes. En aquellos enfermos candidatos a cirugía con IRM normales, sería de indicación la utilización de técnicas funcionales para detectar la zona epileptógena.

**83. Evaluación de los mecanismos implicados en el archivo y en la recuperación de la memoria en la demencia de**

**tipo Alzheimer y en la enfermedad de Parkinson.** Paula Harris<sup>1</sup>, Marina Drake<sup>2</sup>, Ricardo Allegri<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Neuropsicología, CEMIC, CONICET, <sup>2</sup> Servicio de Neurología, Hospital Británico, Buenos Aires.

**Objetivos:** evaluar los mecanismos implicados en el archivo y en la recuperación de la información en pacientes con demencia de tipo Alzheimer (DTA), enfermedad de Parkinson (EP) y en sujetos con deterioro de memoria asociado a la edad (DMAE). **Pacientes y métodos:** fueron estudiados 110 sujetos con DMAE, 40 pacientes con EP y 91 con DTA apareados por edad y escolaridad. La memoria episódica fue evaluada a través del aprendizaje de una lista de palabras (tres ensayos), el recuerdo libre y el recuerdo con facilitación semántica. Se desarrollaron un índice de aprendizaje (IA), de olvido (IO) y de recuperación semántica (IRS). **Resultados:** los pacientes con DTA difieren significativamente (ANOVA) de los DMAE en los tres índices ( $p < 0.001$ ), los pacientes con PK difieren de los DMAE en el índice de aprendizaje ( $p < 0.001$ ), pero no en el de olvido ni en el de recuperación semántica. Con un corte de 0.40 el IO es el que mejor discrimina entre DTA y DMAE (sensibilidad 83%, especificidad 92%). **Conclusiones:** tanto en la DTA como en la EP existen dificultades en el aprendizaje, siendo estas cuantitativamente similares pero cualitativamente diferentes. Los pacientes con DTA, pierden aquello que "aprendieron", debido a que la información estaba archivada en la memoria a corto plazo. Por otro lado, los pacientes con DTA, a diferencia de aquellos con EP, no se benefician de la clave semántica.

**84. Niveles disminuidos de 6-sulfatoximetelatonina (aMT6s) en pacientes con enfermedad coronaria.** Luis Girotti, Manuel Lago, Oscar Ianovsky, Justo Carbajales, Marcelo Elizari, Luis Brusco, Daniel Cardinali.

*División Cardiología, Hospital Ramos Mejía y Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Datos previos indican que pacientes con enfermedad coronaria no especificada presentan niveles disminuidos de melatonina durante la noche. Sin embargo, dichos resultados no permiten discriminar si tal cambio es un hecho común en la afección coronaria o constituye un marcador de estado de la enfermedad. Además, no es claro si esta disminución está vinculada al tratamiento con bloqueantes beta. En el presente estudio determinamos la excreción nocturna de aMT6s en orina en 3 grupos de pacientes: (a) 24 individuos normales ( $63 \pm 13$  años); (b) 32 pacientes con enfermedad coronaria estable ( $62 \pm 11$  años); (c) 27 pacientes con angina inestable ( $62 \pm 12$  años). La aMT6s fue medida por RIA en orina recolectada entre las 1800 y 0600 h. **Resultados:** La excreción urinaria de aMT6s ( $\mu\text{g}$ ) fue significativamente menor en pacientes con angina inestable ( $1.8 \pm 2.4$ ) que en pacientes con angina estable ( $4.7 \pm 4.2$ ) o normales ( $12.5 \pm 14.2$ ) ( $p < 0.001$ , ANOVA no paramétrico). También se correlacionó negativamente con la edad en individuos normales pero no en los coronarios. La excreción de aMT6s en pacientes tratados con bloqueantes adrenérgicos beta no difirió de los no tratados. **Conclusión:** En la enfermedad coronaria se produce menos melatonina, hecho relacionado con riesgo mayor de infarto miocárdico y/o muerte y desvinculado de la existencia o no de bloqueo adrenérgico beta.

**85. Compromiso del sistema opioide y del SNS en el dolor crónico de origen neurógeno.** María de Lourdes Figuerola, Gloria Levin, Marta Barontini.

*Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; Servicio de Neurología. Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.*

El dolor de origen neurógeno está en permanente revisión tanto en su génesis como en su mantenimiento. La distrofia simpática refleja (DSR) es una complicación que aparece luego de un traumatismo o cirugía menor de un miembro. Actualmente la tendencia es considerar al problema como un trastorno del procesamiento

de la señal en el sistema nervioso central, probablemente a nivel espinal. Nosotros comunicamos 6 pacientes con diagnóstico clínico de DSR en los que estudiamos catecolaminas, sus metabolitos y met-enkefalina (ME) plasmáticas en el miembro afectado y en el contralateral, antes y después del tratamiento esteroideo. Los resultados obtenidos muestran una tendencia de la adrenalina y de la dopamina (DA) a ser menores en el miembro afectado. Además la DA tendió a disminuir en el miembro afectado luego del tratamiento pero ninguno de estos cambios resultó estadísticamente significativo. Por su parte la ME no mostró diferencias entre ambos miembros ( $0.21 \pm 0.01$  y  $0.24 \pm 0.01$  pmol/ml) pero sí un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) en la toma realizada post-tratamiento esteroideo ( $0.33 \pm 0.02$  y  $0.34 \pm 0.02$  pmol/ml). Estos resultados son congruentes con la teoría de la alteración del procesamiento central en la que no habría alteraciones humorales periféricas. Por otro lado al efecto antiinflamatorio de la prednisona podría sumarse un analgésico indirecto a partir del aumento de ME por el tratamiento.

**86. Correlación entre memoria visuoespacial y verbal con esclerosis hipocampal en pacientes con epilepsia.** Consalvo Damián, Solís Patricia, Oddo Silvia, Silva Walter, Saidón Patricia, Karakatsanis Marcela, Kochen Silvia

*Unidad Asociada al CONICET. Centro Municipal de Epilepsia. Hospital Ramos Mejía. Buenos Aires.*

Los pacientes con esclerosis hipocampal (EH) tendrían alteraciones en el procesamiento visual/verbal de la memoria. La evaluación neurocognitiva resulta esencial en esta población en los candidatos a cirugía de la epilepsia. El objetivo del trabajo fue valorar la correlación entre las alteraciones de la memoria visual y verbal con la lateralidad de la EH diagnosticada a través de imágenes por resonancia magnética (IRM). Se seleccionaron al azar pacientes con diagnóstico clínico-EEG de epilepsia temporal y EH en las IRM. Los test neuropsicológicos efectuados fueron el coeficiente intelectual, la figura compleja de Rey y el test de aprendizaje auditivo/verbal de Rey. Se incluyeron 12 pacientes, 6 mujeres. En 10 pacientes se objetivó déficit mnésico. En 6 de ellos (60 %) se encontró coincidencia entre el lado afectado por IRM versus los test neuropsicológicos. Tres de estos pacientes tenían EH derecha y déficit de memoria visual, 2 tenían EH izquierda y déficit verbal y un caso con EH bilateral y alteración en ambos tipos de memoria. La correlación fue del 33.3 % si el déficit mnésico era para ambos tipos de memoria valoradas y del 100% si el déficit era de un solo tipo. La evaluación neuropsicológica de pacientes con EH debe contribuir al diagnóstico de lateralidad y pronóstico postquirúrgico.

**87. El trasplante astrogliar en el cuerpo estriado dorsal de monos parkinsonianos mejora el desempeño cognitivo.** Sebastián Lipina, Jorge Colombo, Alberto Yáñez, Carlos Nagle

*Programa Unidad de Neurobiología Aplicada (PRUNA) (CEMIC-CONICET), Buenos Aires.*

A fin de intentar promover la recuperación funcional del neuropilo estriatal de monos con parkinsonismo inducido por administración sistémica del neurotóxico MPTP, se realizaron penetraciones bilaterales con y sin células astrogliales fetales de mono en el cuerpo estriado de *Cebus apella* adultos [Grupo A, sin células (N=2); Grupo B, con células (N=2)]. Se evaluó su condición motora confirmándose el desarrollo de parkinsonismo post tratamiento. Antes y después de cada procedimiento se administró una prueba de Respuesta Diferida Espacial (RDE) con retardos de <1" a 10". Se observó que después de la administración de MPTP la eficiencia fue afectada (retardos Mx alcanzados por animal pre-MPTP: Grupo A: 6" y 10"; Grupo B: 10" y 10"; post-MPTP: Grupos A y B: <1") y los tiempos de reacción ( $p$  entre  $<0.0001$  y  $0.0002$ , Test de  $t$ ) se incrementaron significativamente. Luego de efectuados los procedimientos quirúrgicos el grupo B mostró recuperación mientras que el A no (retardos alcanzados: Grupo A: <1" y 2"; Grupo B: 6" y 8"), y se observó sólo una mejoría parcial en los tiempos de reacción. El trasplante de células astrogliales

fetales fue efectivo para recuperar el desempeño en la prueba de Respuesta Diferida Espacial. Se sugiere una disociación entre los desempeños cognitivo y motor. Agradecimientos: Corpo Médica, Fundación Conectar, CONICET, Fundación Bunge & Born, CEMIC.

## CARDIOVASCULAR II

### 88. Efecto de las radiaciones gamma en el proceso de calcificación de válvulas aórticas biológicas implantadas en ratas. Gloria Lamas\*, Eulogia Kairiyama\*, José Navia\*\*

\*Aplicaciones Biológicas, Ciencias de la Salud, Centro Atómico Ezeiza, Comisión Nacional de Energía Atómica. \*\*Servicio de Cirugía Cardiovascular, Hospital Italiano, Buenos Aires

El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de distintas dosis de irradiación gamma en el proceso de calcificación de válvulas aórticas porcinas fijadas con glutaraldehído. Piezas cortadas de válvulas controles e irradiadas a distintas dosis en una fuente de  $^{60}\text{Co}$  fueron implantadas subcutáneamente en ratas. Se empleó para valorar el grado de calcificación: observación visual en placas radiográficas de rayos X y cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica. Los valores de la concentración de calcio en muestras irradiadas a 25 kGy (kiloGray) e implantadas durante 30, 60 y 90 días fueron  $88.7 \pm 19.0$  mg/g,  $177.4 \pm 23.0$  mg/g y  $182.0 \pm 23.0$  mg/g de peso seco y sus controles de  $94.8 \pm 29.0$  mg/g,  $141.0 \pm 24.0$  mg/g y  $171.5 \pm 29.0$  mg/g de peso seco (NS). A 40 kGy  $72.0 \pm 16.0$  mg/g,  $157.8 \pm 7.0$  mg/g y  $203.5 \pm 28.0$  mg/g de peso seco. Mientras que los valores de sus respectivos controles fueron,  $80.4 \pm 33.0$  mg/g,  $173.2 \pm 19.0$  mg/g y  $206.0 \pm 24.0$  mg/g de peso seco (NS). A 30 kGy la cuantificación de calcio fue  $116.6 \pm 14.0$  mg/g de peso seco y su control de  $121.3 \pm 34.0$  mg/g de peso seco a 30 días (NS).  $X \pm DS$ . En las condiciones y dosis de irradiación de las experiencias, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de calcio entre controles y muestras irradiadas, concluyendo que a las dosis utilizadas la radiación gamma no modifica el proceso de calcificación. De esta manera, la irradiación gamma podría aportar una nueva forma de procesamiento del tejido.

### 89. Correlación entre el núcleo miocítico e insuficiencia cardíaca. Alejandra Camino, Carlos Vigliano, Patricia Cabeza Meckert, Luis Palacios, Rubén Laguens

Universidad Favaloro, Buenos Aires; Universidad Nacional de La Plata.

La miocardiopatía dilatada (MCD) se caracteriza por hipertrofia irregular de los miocitos. El componente nuclear de esta hipertrofia y su correlación con parámetros funcionales cardíacos es el objeto de este estudio. En biopsias endomiocárdicas de la pared septal del ventrículo derecho de 49 pacientes con diagnóstico de MCD en evaluación para trasplante se estudiaron por citomorfometría el grado de ploidía, el área nuclear y su variabilidad, y el diámetro miocítico. En todos los pacientes se determinó la fracción de eyección ventricular izquierda en reposo (FERVI) y el diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI) por ecocardiograma bidimensional. El análisis estadístico se realizó aplicando el coeficiente de correlación de Pearson. Se observó correlación positiva entre el DDVI con el área nuclear ( $p=0.012$ ) ( $r=0.35$ ) y con su variación de tamaño o anisocariosis ( $p=0.004$ ) ( $r=0.40$ ). La FERVI se correlacionó positivamente con la proporción de células tetraploides ( $p=0.04$ ) ( $r=0.29$ ), en tanto que el diámetro miocítico, comúnmente usado para describir la hipertrofia celular, no correlacionó con el DDVI ni con la FERVI. Si bien en los pacientes con MCD los miocitos presentan hipertrofia celular, la anisocariosis y la hipertrofia nuclear pueden ser considerados mejores indicadores de la función cardíaca.

### 90. Incremento de la corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo-L por estimulación de los receptores $\text{AT}_1$ de Angiotensina II en miocitos

### ventriculares de gato: Patch-perforado vs standard whole-cell. Alejandro Aiello, Horacio Cingolani

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

La estimulación de los receptores  $\text{AT}_1$  cardíacos por Angiotensina II (Ang II) produce un efecto inotrópico positivo con aumento del transient de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. La Ang II también produce un alargamiento de la duración del potencial de acción. Los resultados obtenidos al medir la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L ( $I_{\text{Ca}}$ ) son, sin embargo, contradictorios ya que aumento, ausencia de efecto y disminución han sido propuestos. En el presente estudio se determinaron, en miocitos aislados de ventrículo de gato, los efectos de la Ang II sobre  $I_{\text{Ca}}$  registradas bajo los modos standard whole-cell y patch-perforado de la técnica de Patch-Clamp. Sobre un total de 16 células estudiadas utilizando el modo whole-cell, mediante el cual las células son dializadas con solución de pipeta alterando el medio intracelular, 500 nM de Ang II produjo importante disminución de  $I_{\text{Ca}}$  en 8 células, ausencia de efecto en 6 células y pequeño incremento en 2 células (a 0 mV,  $-5.5 \pm 0.6$  pA/pF en control vs  $-4.4 \pm 0.5$  pA/pF en presencia de Ang II, NS). Cuando se minimizó la perturbación del medio intracelular mediante la utilización del patch-perforado, Ang II indujo incremento de  $I_{\text{Ca}}$  en todas las células estudiadas. La densidad de  $I_{\text{Ca}}$  medida a 0 mV fue  $-1.7 \pm 0.2$  pA/pF en control y  $-2.9 \pm 0.3$  pA/pF en presencia de Ang II ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ). Este incremento de  $I_{\text{Ca}}$  fue revertido por la adición del bloqueante específico de los receptores  $\text{AT}_1$ , Losartán (2  $\mu\text{M}$ ), al medio extracelular ( $2 \pm 0.2$  pA/pF;  $n=6$ ,  $p<0.05$ ). Estos resultados sugieren que en miocitos ventriculares cardíacos, la estimulación de los receptores  $\text{AT}_1$  por Ang II incrementan  $I_{\text{Ca}}$  a través de un mediador intracelular cuya acción se pierde durante los registros de standard whole-cell.

### 91. El efecto inotrópico positivo de la Angiotensina II es independiente del $\text{pH}_i$ y es debido en parte a un aumento del calcio intracelular por la activación de la corriente de $\text{Ca}^{2+}$ . Julieta Palomeque, Martín Vila Petroff, Ernesto Aiello, Horacio Cingolani, Alicia Mattiazzi

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

La angiotensina II (Ang II) produce un efecto inotrópico positivo (EIP) en distintas especies. Sin embargo, los mecanismos subcelulares involucrados en este efecto son aún motivo de amplia controversia. El presente trabajo intenta dilucidar el rol del calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) en el EIP de la Ang II en miocitos aislados ventriculares de gato. El  $\text{Ca}^{2+}_i$  (estimado vía fluorescencia de INDO-1/AM) se midió simultáneamente con el acortamiento celular. La administración de Ang II (1  $\mu\text{M}$ ) produjo un aumento máximo del acortamiento celular de  $212 \pm 27\%$  que se asoció con un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  sistólico pico de  $14 \pm 3\%$  y de la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $29 \pm 8\%$  ( $n=9$ ). La Ang II produjo un aumento significativo en la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (patch perforado). La corriente pico registrada a 0 mV en presencia de Ang II aumentó un  $67 \pm 7\%$  ( $n=4$ ). Estos aumentos preceden al cambio de  $\text{pH}_i$  inducido por Ang II medido vía fluorescencia de SNARF-1/AM). El EIP de la Ang II fue abolido por completo en presencia del bloqueante de la PKC, Celastrolina (5-10  $\mu\text{M}$ ) ( $n=6$ ). Se concluye que el EIP de la Ang II es dependiente de PKC y estaría mediado por un aumento de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L que contribuiría al aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

### 92. Homocisteinemia (Hcys) y polimorfismo de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en hipertensión esencial (HE). Victoria A.M. Garfunkel, Silvia I. García, Patricia I. Porto, Yankel Plotquin, Tobías Kirsznar, Claudio González, Fabiana Leonardi, Adrian Perusco, Carlos J. Pirola

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Centro de Hipertensión, Hospital Zubizarreta, Buenos Aires

La hiperhomocisteinemia parece ser un factor de riesgo cardiovascular y estar asociado a la variante C677T de la MTHFR, enzima que participa en su metabolismo. Nuestro objetivo fue analizar la asociación entre la Hcys, la variante C677T de la MTHFR y la HE. Se estudiaron 53 normotensos (edad:  $55.1 \pm 8.7$ ; 37 mujeres) y 127 hipertensos (edad:  $58.8 \pm 9.1$ ; 91 mujeres). No hubo diferencias significativas en los niveles de Hcys, ni en la frecuencia de los genotipos de la MTHFR, que están en equilibrio de Hardy-Weinberg, entre ambos grupos (NT:  $12.9 \pm 7.2$  uM; CC: 43.4%, CT: 47.2%, TT: 9.4%; HT:  $13.8 \pm 9.6$  uM; CC: 36.2%, CT: 48.0%, TT: 15.8%). La prevalencia de hiperhomocisteinemia es alta (29.7%) en la población total y la Hcys correlaciona con la edad y la glucemia (Spearman  $R=0.182$  y  $0.163$ ,  $p < 0.024$  y  $p < 0.04$ ;  $n=154$ ). Los homocigotas CC de la MTHFR muestran una mayor relación insulina/glucosa (CC:  $0.28 \pm 0.14$ ; CT+TT:  $0.23 \pm 0.14$ ) así como también presentan más antecedentes familiares de diabetes (CC: 32.61%, CC+TT: 17.28%). En síntesis, la hiperhomocisteinemia y la variante C677T de la MTHFR no estarían asociadas a HE pero sí a mayores niveles de glucemia y relación insulina/glucosa, lo que sugeriría que podrían ser marcadores de resistencia a insulina.

**93. Evolución de las variables hemorreológicas en el curso de la artritis reumatoidea crónica (ARC).** Alejandra Luquita, Ana Gennaro, Leda Urli, Alicia Dominighini, María Svetaz, Ricardo Volpintesta, Simón Palatnik, Marta Rasia

*Facultad de Ciencias Médicas y Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional de Rosario; INTEC (CONICET), Universidad Nacional del Litoral.*

En un trabajo anterior se había observado que la deformabilidad eritrocitaria resultaba un indicador de actividad de la ARC más fidedigno que los tests bioquímicos generalmente utilizados. En el presente, se estudió la evolución en el tiempo de la deformabilidad eritrocitaria y su consecuencia -el aumento de la viscosidad sanguínea relativa- en 8 mujeres que presentaban en su examen clínico 4 de los 5 criterios internacionales de ARC y que recibían como tratamiento corticoides no esteroides y antiinflamatorios. Durante 4 años, se determinaron anualmente la viscosidad sanguínea relativa corregida a un hematocrito 45% utilizando un viscosímetro cono-plato a un gradiente de velocidad de  $230 \text{ s}^{-1}$  y la deformabilidad eritrocitaria por filtración a través de membranas de 5 mm. Se comprobó que la viscosidad sanguínea relativa y la deformabilidad eritrocitaria disminuían progresivamente desde el inicio ( $p < 0.01$ ) alcanzando valores fisiológicos al tercer año, en el que la enfermedad se inactivó en el 50% de los pacientes. Durante el cuarto año de tratamiento se inactivó en todos los pacientes ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias en la deformabilidad eritrocitaria ni en la viscosidad sanguínea relativa en este período ( $p > 0.2$ ). Estos resultados corroboran la relación entre la deformabilidad eritrocitaria y la actividad de la ARC que puede estar reflejando una agregación difusa de la enfermedad a todas las células de la economía.

## INTERDISCIPLINARIA

**94. Evaluación de los marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedad de Graves tratados con metilmercaptoimidazol y  $I^{131}$ .** Marisa Repetto, Marcos Abalovich, Susana Llesuy

*Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

La enfermedad de Graves (EG) es la causa más común de hipertiroidismo, donde los anticuerpos a receptores de TSH estimulan la síntesis de hormonas tiroideas. El objetivo de este trabajo fue evaluar los marcadores periféricos de estrés oxidativo (MPEO) en sangre de pacientes EG antes y después de recibir  $0.5 \text{ mg/Kg/día}$  de metilmercaptoimidazol (MMI) y  $5 \text{ MBq}$  de  $I^{131}$ . Se determinaron: capacidad antioxidante total del plasma (TRAP), quimioluminiscencia iniciada por hidróperóxido de *tert*-

butilo (QI), la actividad de las enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), el contenido de glutatión total (GSH), *in vivo*, y la capacidad antioxidante *in vitro* del MMI por luminiscencia. En EG se observó un aumento de QI del 100% ( $p < 0.001$ ), disminución de CAT y SOD del 26% ( $p < 0.05$ ) y 43% ( $p < 0.05$ ) respectivamente, y disminución de GSH del 40% ( $p < 0.05$ ) respecto a controles. MMI incrementó el TRAP en un 100% ( $p < 0.001$ ), CAT, SOD y GPx en 37% ( $p < 0.05$ ), 75% ( $p < 0.05$ ) y 100% ( $p < 0.001$ ) respectivamente, disminuyó un 46% QI ( $p < 0.001$ ) y GSH aumentó un 100% respecto a EG.  $I^{131}$  aumentó el TRAP, CAT, SOD y GSH un 39% ( $p < 0.05$ ), 43% ( $p < 0.01$ ), 100% ( $p < 0.05$ ) y 100% ( $p < 0.001$ ). MMI posee actividad antioxidante (atrapa 0,02 radicales peróxido por mol de MMI (n) y es el 50% eficiente respecto al Trolox, n Trolox=2). Conclusiones: Los MPEO alterados en EG mejoran con el tratamiento antitiroideo, sugiriendo la protección *in vivo* al daño oxidativo y la capacidad antioxidante del MMI *in vivo* e *in vitro*.

**95. Eventos GABAérgicos hipotalámicos pre- y postsinápticos asociados a la inhibición de la secreción de LH inducida por endotoxina (LPS).** Carolina Jaliffa\*, Carlos Feleder, Ruth Rosenstein\*, Inés Keller Sarmiento\*, Pablo Arias

*Departamentos de Fisiología y de Bioquímica\*, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Evaluamos, en ratas Wistar macho adultas (280-320 g) castradas, el efecto de la administración periférica de LPS (250  $\mu\text{g/kg}$  i.p.1) sobre la secreción de LH medida *in vivo*, 2) sobre la liberación *ex vivo* de GABA por parte de fragmentos hipotalámicos (hipotálamo anterior y mediobasal -AMBH-) en incubación, 3) sobre el transporte de  $^{36}\text{Cl}^-$  (basal y estimulado por GABA 0,1 mM) por parte de sinaptoneurosomas obtenidos a partir de homogenatos de AMBH, y 4) sobre el binding de muscimol- $^3\text{H}$  a membranas de la misma procedencia. Los animales (n=6-8/grupo) fueron decapitados 90 min tras la inyección de LPS o salina, obteniéndose sangre troncal. Los AMBH fueron disecados e incubados en medio de Earle durante 30 min, o bien homogeneizados. Dosamos LH por RIA y GABA por HPLC-UV previa derivatización con PITC. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de Wilcoxon para datos no apareados. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM:

	LH (ng/ml)	GABA pmol/30'	Flujo $^{36}\text{Cl}^-$ basal	estim	Binding Bmax	Kd
<b>CON</b>	$57 \pm 8$	$210 \pm 34$	$37 \pm 5$	$108 \pm 15$	$434 \pm 30$	$24 \pm 5$
<b>LPS</b>	$13 \pm 8^*$	$380 \pm 45^*$	$56 \pm 15$	$38 \pm 17^*$	$480 \pm 35$	$22 \pm 5$

\*  $p < 0.05$  vs. CON

La inhibición de la secreción de LH observada tras LPS i.p. se acompaña de un incremento en la liberación hipotalámica de GABA. El aumento del tono GABAérgico endógeno sería responsable de la falta de respuesta del influjo de cloruros a la estimulación, y no tendría la magnitud o la duración requeridas para modificar las características del binding en la postsinapsis.

**96. El tratamiento intracerebroventricular (icv) con oligonucleótidos antisense (AS) contra TRH normaliza la presión arterial (PA) en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR).** Silvia I. García, Azucena L. Alvarez, Victoria MA Garfunkel, Patricia Porto, Adrian Perusco, Fabiana Leonardi, Samuel Finkielman, Carlos J. Pirola

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

El sistema de la TRH extrahipotalámico participa en la regulación cardiovascular. Recientemente encontramos que su sobreexpresión produce hipertensión reversible mediante tratamiento AS en la rata normal. Como las SHR presentan una hiperactividad

de este sistema, nuestro objetivo fué estudiar el efecto de la inyección icv con oligonucleótidos fosforotioatos AS en ratas machos SHR y WKY adultas. Como muestra la tabla (media±DS), el AS (50 ug) produjo una disminución significativa (ANOVA con medias repetidas,  $p < 0.02$ ,  $n=8$ /grupo) de la PA a las 24 y 48 hs, efecto que se acompañó de una disminución del elevado contenido de TRH (RIA) diencefálico normalmente observado en las SHR respecto de las WKY. Dichos efectos no se hallaron con oligonucleótidos sense.

Cepas/Trat.	PA basal	PA 24hs	PA 48hs	PA 72hs	TRHpg/mg	
WKY	Control	105±7	100±7	108±4	107±11	900±42
	Sense	110±7	115±10	108±10	107±7	856±55
	AS	117±4	105±6	98±9	106±20	992±68
SHR	Control	160±6	168±7	155±7	162±10	1250±81*
	Sense	165±8	173±8	159±6	164±11	1345±120
	AS	160±12	120±18*	123±19*	150±29	729±158#

En resumen, se observa por primera vez que el tratamiento AS disminuye los niveles elevados de TRH diencefálica y normaliza la PA de las SHR demostrando que el sistema de la TRH participa en el mantenimiento de la hipertensión en este modelo.

#### 97. Síndrome de lipodistrofia (SLD) y riesgo cardiovascular (CV) en pacientes HIV+ tratados con inhibidores de la proteasa (IP). Carla Musso<sup>1</sup>, Pablo Arias<sup>1</sup>, Cristina Ezcurra<sup>2</sup>, Alejandra Monticelli<sup>2</sup>, Amalia Alessandri<sup>3</sup>, Mirta Gurfinkiel<sup>1</sup>, Isaac Sinay<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicios de Endocrinología; <sup>2</sup> Infectología, y <sup>3</sup> Laboratorio Central, Hospital Francés, Buenos Aires.

**Objetivos:** 1) detectar, en pacientes HIV+ en tratamiento antirretroviral con IP, alteraciones metabólicas relacionadas con riesgo CV, y estudiar su asociación con cambios en la distribución grasa; 2) establecer la prevalencia del SLD (lipodistrofia + dislipidemia) en estos pacientes. **Pacientes:** estudiamos 53 pacientes ambulatorios HIV+ (13 F, 46 M, edad  $39 \pm 1$  años, BMI  $26 \pm 1$  kg/m<sup>2</sup>) tratados con un IP, y 39 sujetos sanos de edad y BMI similares (grupo control). **Métodos:** distribución adiposa, BMI (peso/talla<sup>2</sup>), cociente cintura/cadera (C/C), tensión arterial (TA). Medimos glucemia e insulinemia (RIA) basales y post glucosa oral, colesterol total (COL), triglicéridos (TG), carga viral y concentración de CD4. La sensibilidad insulínica (SI) fue calculada mediante el índice HOMA (Matthews y col.). Para la evaluación estadística empleamos la prueba de Wilcoxon para datos no apareados. **Resultados:** (promedio ± SEM) los pacientes HIV+ tratados con IP presentaron glucemias ( $91 \pm 2$  mg/dl), insulinemias ( $17 \pm 2$  mU/l) y triglicéridos basales ( $284 \pm 32$  mg/dl) más elevados que los controles ( $82 \pm 2$  mg/dl,  $9 \pm 2$  mU/l y  $110 \pm 23$  mg/dl respectivamente,  $p < 0,05$ ). El índice de SI fue de  $3,8 \pm 0,7$  vs.  $1,9 \pm 0,5$  ( $p < 0,05$ ). No se detectaron diferencias significativas en los niveles de TA ni de COL. El 62% de los pacientes HIV+ presentó las características clínicas y metabólicas del SLD. En ellos, las alteraciones metabólicas eran mucho más marcadas. **Conclusiones:** 1) en relación a los controles, los sujetos HIV+ estudiados presentan un perfil metabólico proaterogénico, siendo la prevalencia de SLD en los mismos del 62%; 2) la distribución adiposa alterada conlleva un riesgo CV más elevado; 3) se deduce, de lo anterior, la necesidad de estudios prospectivos destinados a evaluar el impacto del riesgo CV aumentado sobre órganos blanco.

#### 98. Interacción entre el receptor ErbB-2, perteneciente a la familia de receptores con actividad de tirosina quinasa (RTKs) tipo I y el receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-RI), un RTK tipo II, en el crecimiento hormono-dependiente (HD) e -independiente (HI) de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA). Leticia Labriola, Eugenia Balañá, Mariana Salatino, Federico Movsichoff, Giselle Peters, Martín Orcoyen, Eduardo Charreau, Patricia Elizalde

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

Demostramos previamente que oligodesoxinucleótidos antisense (ASODNs) al mRNA del ErbB-2 y ASODNs al mRNA del IGF-RI inhiben la proliferación inducida por MPA de células HD y la proliferación autónoma de células HI de carcinomas mamarios. Investigamos el potencial antiproliferativo del bloqueo simultáneo de ErbB-2 e IGF-IR. ASODNs al ErbB-2 (1  $\mu$ M) inhibieron en un 52% la proliferación inducida por MPA 10 nM en células HD (incorporación de <sup>3</sup>H timidina) y en un 50% el crecimiento de células HI. ASODNs al IGF-IR (1  $\mu$ M) inhibieron 47% la proliferación HD y 49% la HI. La combinación de 1  $\mu$ M ASODNs al ErbB-2 y 1  $\mu$ M ASODNs al IGF-IR resultó en un 60%-69% de inhibición en células HD y HI, indicando falta de efectos sinérgicos o aditivos de los ASODNs. ASODNs al ErbB-2 no afectaron los niveles de proteína (Western blots) de IGF-IR. ASODNs al IGF-IR tampoco modificaron los niveles de ErbB-2. El tratamiento de células HD y HI con ASODNs al IGF-IR inhibió la fosforilación en tirosina del ErbB-2. Sin embargo, ASODNs al ErbB-2 no afectaron la fosforilación en tirosina de IGF-IR. El MPA indujo en células HD la asociación de ErbB-2 e IGF-IR. Asociación entre estos RTKs se encontró también en el crecimiento autónomo de la células HI. Los resultados demuestran una interacción jerárquica, donde el IGF-IR dirige la activación de ErbB-2 a través de la formación de un complejo binario.

### ENDOCRINOLOGIA IV

#### 100. Posible mecanismo de acción de IL1 $\beta$ en la regulación de la actividad de $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa ( $\gamma$ GTP) en células de Sertoli. Silvina Meroni<sup>1</sup>, Angela Suburo<sup>2</sup>, Selva Cigorraga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños "R. Gutiérrez", <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Buenos Aires.

Hemos demostrado previamente que el óxido nítrico (NO) participa en la regulación funcional de la célula de Sertoli y se postuló que la IL1 $\beta$  podría utilizar esta señal. El objetivo de este trabajo fue analizar el mecanismo por el cual IL1 $\beta$  estimula la actividad de  $\gamma$ GTP. Se utilizaron cultivos de células de Sertoli de rata de 20 días de edad. Por inmunohistoquímica se demostró que la IL1 $\beta$  (50 ng/ml) produce translocación nuclear del factor de transcripción NFkB y aumenta la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) inmunoreactiva. No se observó efecto de 8-Br-GMPc sobre la actividad de  $\gamma$ GTP (basal:  $35.8 \pm 2.3$ ; GMPc: 0.1mM:  $32.6 \pm 3.5$ ; 1mM:  $37.1 \pm 2.5$ , pmol/ $\mu$ gDNA/min) sugiriendo que la activación de la guanilato ciclasa no participa en el estímulo de esta actividad enzimática. Utilizando un anticuerpo específico contra nitrotirosina se observó un aumento de proteínas nitrosiladas en las células estimuladas con IL1 $\beta$ . El agregado de un liberador de NO (S-Nitroso-N-Acetilpenicilamina) en el ensayo enzimático de la actividad de  $\gamma$ GTP permitió descartar un efecto directo del NO sobre dicha actividad enzimática. Los resultados obtenidos demuestran que la IL1 $\beta$  transloca el NFkB al núcleo de las células de Sertoli y estimula la síntesis de iNOS aumentando la producción de NO. El NO producido aumentaría la actividad de  $\gamma$ GTP por un mecanismo independiente de GMPc y que no involucra la activación directa de la enzima.

#### 101. Interacción FSH-testosterona en la regulación de la secreción de hormona anti-Mülleriana (AMH) por el testículo humano. Rodolfo Rey<sup>1,2</sup>, Jacques Young<sup>3</sup>, Gilbert Schaison<sup>3</sup>, Nathalie Josso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CEDIE, Hospital de Niños, Buenos Aires; <sup>2</sup>Endocrinologie du Développement (INSERM), Montrouge, <sup>3</sup>Service d'Endocrinologie, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, Francia.

La AMH sérica disminuye en la pubertad masculina normal, pero está aumentada en pacientes recién nacidos y puberales con defectos en la síntesis o en la acción de los andrógenos. Nues-

tro objetivo fue estudiar si existe una interacción entre la FSH y los andrógenos en la regulación de la AMH durante la infancia y la pubertad humanas, utilizando modelos de la patología. Se midió AMH, FSH y T séricas en varones con hipogonadismo hipogonadotrófico congénito (HHC) antes y después del tratamiento con hCG (n=6, 19-30 años) o con enantato de testosterona (T) (n=6, 19-28 años), y en 5 pacientes con aplasia de células de Leydig (ACL) (19-42 años) y 6 con síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos (CAIS) (12-17 años), antes del tratamiento. Los pacientes con HHC mostraron valores bajos de FSH ( $0,6 \pm 0,4$  UI/l) y T ( $1,7 \pm 0,7$  nmol/l) y altos de AMH ( $314 \pm 93$  pmol/l). La hCG aumentó la T y disminuyó la AMH ( $56 \pm 30$  pmol/l;  $p < 0,01$ ). El enantato de T provocó una disminución menos significativa de la AMH ( $114 \pm 50$  pmol/l;  $p < 0,05$ ). Los pacientes con ACL y CAIS tuvieron FSH normal ( $6,1 \pm 2,9$  UI/l) y AMH muy elevada ( $1303 \pm 720$  pmol/l). Estos resultados sugieren que la inhibición puberal de la AMH dependería de la concentración intratesticular de T. En ausencia de dicho efecto inhibitorio, la AMH permanece en valores prepuberales normales si no hay estímulo gonadotrófico, pero se eleva significativamente al aumentar la FSH.

**102. Regulación de la síntesis de estrógenos y andrógenos en testículos con tumor calcificante de células grandes de Sertoli (LCCSCT) en edad prepuberal y puberal.** Esperanza Berensztein, Nora Saraco, Hernán Mendilaharsu, Alicia Belgorosky, Marco Rivarola

*Laboratorio de Investigación, Hospital Garrahan, Buenos Aires.*

La ginecomastia es el signo clínico predominante en LCCSCT. Este estudio tiene como objetivo analizar la secreción de testosterona (T) y la actividad aromatasa (ARO) -definida como estradiol (E2) en presencia de T exógena- basal (b) y bajo LH, FSH y GH en células gonadales en cultivo (6 días) de 2 pacientes (P) con LCCSCT con ginecomastia bilateral. P1 de 10,2 años (a), desarrollo sexual G1 y VP1, y niveles séricos prepuberales (PP) de T, androstenediona (A), E<sub>2</sub>, LH y FSH b y post GnRH y P2 de 12,1 a, G3, VP3, y niveles séricos puberales (PUB) de T, A, E<sub>2</sub>, LH y FSH b y post Gn-RH. Los controles fueron cultivos testiculares de niños entre 1-7 a (n=4), CPP, y de 15 a (n=2), CPUB. En los LCCSCT-PP, la T basal y post-estímulo fue indetectable, a diferencia de los CPP en los que la T basal aumentó durante el cultivo. En los LCCSCT-PUB, la T basal disminuyó durante el cultivo, al igual que en los CPUB, pero aumentó en respuesta a FSH ( $256 \pm 19\%$ ), LH ( $299 \pm 88\%$ ) y GH ( $339 \pm 129\%$ ), a diferencia de los controles, en los que no hubo cambios. ARO fue significativamente mayor en los tumores que en sus respectivos controles, siendo mayor en tumores en la PUB que en la PP. Se concluye que en LCCSCT, tanto en la PP como en la PUB, hay un aumento de la actividad aromatasa, aún bajo el estímulo gonadotrófico de la PUB y que tanto las gonadotropinas como la GH tendrían una función moduladora sobre la célula de Sertoli tumoral, probable fuente de ARO.

**103. Estudio sobre la expresión del gen CYP19 y del gen 3β-HSD en tumores calcificantes de células grandes de Sertoli (Tu).** Nora Saraco, Esperanza Berensztein, Andrea Dardis, Marco Rivarola, Alicia Belgorosky

*Laboratorio de Investigación, Hospital Garrahan, Buenos Aires.*

Ha sido descrito en pacientes con Tu ginecomastia y/o pubertad precoz. No existe información disponible sobre la abundancia (ab) del ARNm de CYP19 ni de 3β-HSD como marcadores de la esteroidogénesis. El objetivo fue analizar en 3 tejidos Tu la ab del ARNm de CYP19 y 3β-HSD por RT-PCR semicuantitativa: 2 tejidos de 12,1 y 15,2 años con niveles puberales (PUB) de testosterona sérica (T) y con respuesta puberal de LH al GnRH (TuPUB) y uno de 10,2 años con niveles prepuberales (PP) de T y respuesta PP de LH al GnRH (TuPP). Los 3 presentaron ginecomastia bilateral. El estradiol sérico fue en TuPUB 18,3 y

11 pg/ml y en TuPP  $< 5$  pg/ml. La ab del ARNm de CYP19 en los Tu fue comparada con un grupo control PP (CPP1) (n=8)  $X \pm DS = 1,5 \pm 1,18$  UA, límite de confianza (LC) superior al 95% de 2,5 UA y la de 3β-HSD (CPP2) (n=3) mediana=0,63, rango 0,43-2,2 UA. En los TuPub la ab del ARNm de CYP19 fue  $10,8 \pm 1,2$  y  $5,6 \pm 1,2$  UA superior al LC del CPP1 y de 3β-HSD fue  $3,74 \pm 0,44$  y  $10,7 \pm 1,5$  UA superior a la mediana y al rango de CPP2. En el TuPP la ab del ARNm de CYP19 de  $4,1 \pm 0,4$  UA fue superior al CPP1 y de 3β-HSD de  $427,0 \pm 33,4$  UA fue superior a la mediana y rango del CPP2. Se describe por primera vez que la expresión de los genes de CYP19 y 3β-HSD en Tu es superior al tejido testicular PP normal. A pesar de que la implicancia de estos resultados debería ser dilucidada, el marcado incremento de la expresión del gen de 3β-HSD en el TuPP podría estar sugiriendo un rol paracrino del tejido tumoral sobre la célula de Leydig vecina.

**104. Rol de la relación (R) entre la abundancia de los ARNm de la enzima 3β-HSD y p450c21 en el balance entre los esteroides c19 y c21 en la adrenal humana (AH).** Andrea Dardis, Nora Saraco, Esperanza Berensztein, Marco Rivarola, Alicia Belgorosky

*Laboratorio de Investigaciones Hospital Garrahan, Buenos Aires.*

Hemos descrito que la actividad 3β-HSD podría ser la llave reguladora de la síntesis de andrógenos en la AH. El objetivo de este estudio fue analizar la R entre la abundancia de los ARNm de 3β-HSD/P450c21 en tejido AH normal de sujetos entre 0 y 8 (Gr1) y entre 8 y 13 años (Gr2); en 2 tumores adrenales virilizantes (TV) y en un tumor síndrome de Cushing (TSC). Además se analizó la R bajo ACTH e IGF-I en cultivo primario de 1 TV y 1 TSC. La abundancia de los ARNm fue analizada por RT-PCR semicuantitativa. En el Gr1 la R fue más alta que en el Gr2 pero en ambos más alta que en TV mientras que se halló una R extremadamente elevada en TSC ( $96 \pm 39,5$ ,  $47,5 \pm 18$ ,  $6,04 \pm 3,4$  y  $870$  respectivamente,  $p < 0,04$ ). In vitro la R basal fue más alta en el TSC ( $27,1 \pm 3,59$ ) que en el TV ( $1,71 \pm 0,06$ ),  $p = 0,001$ , y se halló una disminución con ACTH y un aumento con IGF1 ( $p = 0,001$ ). El incremento de R se asoció a una disminución de dehidroepiandrosterona sulfato (DS), mientras que la disminución de R con incremento de DS ( $p < 0,05$ ). El cortisol solo pudo ser incrementado con ACTH en el TSC ( $779 \pm 193$  vs  $1412 \pm 223$ ,  $p < 0,05$ ). En el TSC, en presencia de una alta abundancia de 3β-HSD y una abundancia extremadamente baja de P450c21 fue suficiente para sintetizar cortisol. Se concluye que la R, 3βHSD/P450c21 podría jugar un rol en el balance esteroidogénico adrenal entre esteroides c19 y 21.

## INMUNOLOGIA

**105. Participación de las hormonas tiroideas en la regulación de la respuesta inmune en un modelo de stress crónico.** Alexis Lysionek, Graciela Cremaschi, Alicia Klecha, Gabriela Gorelik, Ricardo Caro, Ana Genaro.

*Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO-CONICET) y Laboratorio Metodología de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*

La relación entre la función tiroidea y los desórdenes afectivos ha sido tema de considerable investigación. Por otra parte, previamente comprobamos la existencia de un circuito de control bidireccional entre el sistema inmune (SI) y el eje tiroideo. Se analiza la relación entre el eje tiroideo y el SI en un modelo animal de stress crónico (ASC). Se determinaron por radiometría los niveles séricos de hormonas tiroideas en animales normales (C) y en ASC. Las hormonas tiroideas están disminuidas en ASC (T3(ng/dl): controles (C):  $74,8 \pm 5,1$  vs ASC:  $57,1 \pm 4,2$ ;  $p < 0,05$ ; T4(ug/dl): C:  $3,11 \pm 0,28$  vs ASC:  $2,66 \pm 0,15$ ; ns). Por otra parte, la inmunización de animales normales con células alogeneicas (I) indujo un aumento en los niveles de T3 y T4 (basal:  $75,2 \pm 5,8$  vs I:  $120,5 \pm 9,2$ ,  $p < 0,05$ ; basal:  $2,98 \pm 0,25$  vs I:  $4,70 \pm 0,33$ ,  $p < 0,05$ ; respecti-

vamente). En ASC no se observó tal aumento, siendo el título de aloanticuerpos obtenido menor que el correspondiente a los animales control ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ). La administración de hormonas tiroideas a ASC restableció la respuesta aloinmune. Concluimos que existiría una hipofunción tiroidea en los ASC la que conduciría a una deficiente respuesta inmune. Estos resultados permiten postular la existencia de una relación entre el estado de stress crónico, el eje tiroideo y la respuesta inmune.

#### 106. Expansión de diferentes clones linfocitarios B por cultivo de leucocitos periféricos (LMP) de pacientes HIV+.

Carolina Bayo-Hanza, Patricia Baré, Liliana Belmonte, Mariano Scolnik, Fernanda Palacios, Marta de Bracco, Beatriz Ruibal-Ares

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

El objetivo de este trabajo fue estudiar las características de los distintos clones de linfocitos B expandidos a partir LMP obtenidos de una misma muestra de sangre de pacientes HIV+. Para la obtención de las líneas celulares se sembraron  $2 \times 10^6$ /ml mononucleares en distintos tubos. Estos se mantuvieron en cultivo con recambio de medio cada 2-3 días, evitando alterar la interacción celular. Luego de 15 días, se realizaron observaciones semanales para observar cambios morfológicos. El fenotipo se determinó por citometría de flujo usando anti-CD19, CD40, CD30, CD83, CD138, CD23, CD38, HLA-DR, anti- $\kappa$  y  $\lambda$ , anti cadenas pesadas  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\delta$ . Además se extrajo DNA para estudiar los reordenamientos de los genes de las cadenas pesadas por PCR. Se estudiaron 18 líneas obtenidas de 4 pacientes HIV+ y de 1 donante normal (2-7 líneas diferentes por paciente). En 10 de ellas se observó restricción para cadenas  $\kappa$ , en 4 se observó expresión de  $\lambda$  y 4 fueron negativas para  $\kappa$  y  $\lambda$ . En 2 líneas sólo se observó expresión de IgM; en 8: IgM+IgD; en 3: IgG; en 1: IgG+IgM; en 1: sólo IgA; en 2 no hubo expresión de cadenas pesadas. La clonalidad se confirmó por PCR. En un mismo paciente se obtuvieron líneas con diferente clonalidad e intensidad de expresión de marcadores de diferenciación o activación (CD138, HLA-DR, CD38, CD23). Los resultados indican que en los pacientes HIV+, es posible obtener la expansión de diferentes clones surgidos de linfocitos B en distinto estadio madurativo coexistentes en un mismo momento. Estas células podrían estar relacionadas con la génesis de Linfomas no Hodgkin en los pacientes HIV+.

#### 107. Efecto de priming de una galectina-1 sobre la liberación de lisozima en neutrófilos (PMN) homólogos activados con PMA. María Chiesa, María Elola, Nilda Fink.

*Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.*

Las galectinas poseen especificidad  $\beta$ -galactosídica y secuencias consenso distintivas. Se estudió la estimulación de PMN porcinos con la galectina-1 esplélica homóloga, aislada en este laboratorio, en la liberación de lisozima medida mediante la lisis de *Micrococcus lysodeikticus*. El 100% de liberación se obtuvo por incubación de PMN en Triton X-100 0,2%. Los ensayos de liberación de lisozima de PMN se estandarizaron utilizando activadores conocidos como el tripéptido formil-metionin-leucil-fenilalanina (fMLP: 1000-25  $\mu$ M) y el forbol-12 miristato-13 acetato (PMA: 324-32,4  $\mu$ M). Las incubaciones con fMLP se efectuaron con y sin citocalasina B (CB, 5  $\mu$ g/ml). El fMLP con CB produjo un porcentaje máximo de liberación de  $45 \pm 31$  a una concentración de 250  $\mu$ M ( $n=3-10$ ). No se obtuvieron diferencias significativas entre los porcentajes de secreción (17-9%) para las distintas concentraciones de PMA ( $n=5$ ). La galectina-1 porcina fue activa solamente a concentraciones  $\geq 2,5$   $\mu$ M ( $15 \pm 13\%$ ,  $n=4$ ). El priming de PMN con galectina-1 (1  $\mu$ M) durante 15 min. y posterior activación con dosis subóptimas de PMA (0,1  $\mu$ M) produjeron un  $15 \pm 9\%$  ( $n=4$ ) de secreción de enzima, mientras que las mismas dosis de cada uno de estos activadores utilizados en forma independiente no tuvieron efecto. Se concluye que la galectina-1

esplélica porcina y el PMA tienen efectos sinérgicos sobre la liberación de lisozima en PMN homólogos.

#### 108. Análisis del estado funcional de neutrófilos (PMN) en pacientes con síndrome urémico hemolítico (SUH). Gabriela Fernández\*, Carolina Rubel\*, Macarena Beigier Bompadre\*, Graciela Dran\*, Flavia Ramirez\*\*, Laura Lopez\*\*, Mario Diaz\*\*, Martín Isturiz\*, Marina Palermo\*

*\*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina; \*\* Nefrología, Hospital Nacional de Pediatría, Buenos Aires.*

El SUH se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal de grado variable, siendo el nivel de neutrofilia observada en los pacientes un parámetro de mal pronóstico. Nuestro objetivo fue analizar el grado de activación de los PMN de sangre periférica en niños con SUH en el episodio agudo previo a la diálisis ( $n=7$ ) y tras su recuperación (rec;  $n=5$ ). Como controles se estudiaron niños urémicos ( $n=6$ ) o niños a ser operados (op;  $n=8$ ). No se encontraron diferencias entre grupos en la integrina CD11b y el receptor para Fc de IgG (RFc $\gamma$ ) tipo II. La media de intensidad de fluorescencia respecto a controles adultos (%MIF) del RFc $\gamma$ III se encontró disminuida en los SUH (SUH= $30 \pm 9$ ; urémicos= $65 \pm 6$ ,  $p=0.02$ ; op= $104 \pm 11$ ,  $p=0.0011$ ). El marcador de degranulación de PMN CD66b, presentó una tendencia a la disminución en los SUH. Tanto el RFc $\gamma$ III como el CD66b retornaron a los valores normales en los recuperados. Se analizaron dos funciones asociadas a los RFc $\gamma$ : la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA) y la mediada por radicales libres inducida por complejos inmunes (Ctx-CI). Mientras no se encontró diferencia en la Ctx-CI, la CCDA disminuyó significativamente en los SUH con respecto a los urémicos y los recuperados (%CCDA: SUH= $41.7 \pm 5.9$ ; urémicos= $76.0 \pm 6.7$ ,  $p<0.02$ ; op= $60.5 \pm 6.8$ ; rec= $65.0 \pm 3.5$ ,  $p<0.02$ ). Estos resultados sugieren que en el SUH los PMN circulantes han sufrido un proceso de activación presentando pérdida de receptores y menor respuesta en funciones mediadas por RFc $\gamma$ .

#### 109. Origen de los linfocitos intraepiteliales intestinales (LIEi) en modelo de inmunodeficiencia secundaria. Gabriela Márquez, Adriana Galeano\*, Estela Roux

*Departamento Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. \*Sanatorio Mater Dei, Buenos Aires.*

El objetivo de este trabajo fue el de contribuir al estudio del origen extratímico de los LIEi CD8 $\alpha/\alpha$ + TCR $\gamma/\delta$ +. Se determinó por citometría de flujo el fenotipo de los LIEi de ratas Wistar que al destete recibieron dieta libre de proteínas que contiene dextrina y a continuación caseína 20% durante 21 días (R21) –modelo experimental de inmunodeficiencia secundaria- comparándolo con el fenotipo de los LIEi de ratas controles (C). Resultados: X  $\pm$  ES, C vs R21, ( $n=3-9$ ). Se observó en R21 un aumento de LIEi CD8 $\alpha/\alpha$ +, CD25+ y TCR $\gamma/\delta$ + (CD8 $\alpha/\alpha$ :  $17.0 \pm 3.7$  vs  $43.4 \pm 5.4$ , CD25:  $2.1 \pm 0.5$  vs  $25.8 \pm 2.7$ , TCR $\gamma/\delta$ :  $15.3 \pm 1.6$  vs  $32.7 \pm 5.8$ ;  $p<0.005$ ), acompañado por una disminución de LIEi CD3+ y TCR $\alpha/\beta$ + (CD3:  $62.3 \pm 4.6$  vs  $34.8 \pm 8.0$ , TCR $\alpha/\beta$ :  $52.8 \pm 4.2$  vs  $36.3 \pm 5.5$ ;  $p<0.03$ ). Conclusión: el aumento las subpoblaciones LIEi mencionadas se debe: a) a una maduración extratímica en el epitelio intestinal, favorecida por la carga antigénica (dextrina), o b) a un origen "in situ" considerando al epitelio intestinal como órgano linfóide primario. Esto estaría avalado por experimentos previos en los que se demostró un incremento de los LIEi CD8 $\alpha/\alpha$ + TCR $\gamma/\delta$ + en R21( $n=5$ ) ( $21.0 \pm 2.4$ ) vs C ( $n=7$ ) ( $6.4 \pm 1.4$ ),  $p<0.0002$ , pues-to que se conoce que las células  $\gamma/\delta$ + pueden generarse en el intestino fetal. (CONICET PIP 4147 y UBA TB 072).

#### 110. Activación del receptor AT1 de angiotensina en la osteoartritis experimental inducida por Carragenina. Yanina Pereyra, Silvina Raiden, Azucena Alvarez, Víctor Nahmod

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

El hallazgo, en nuestro laboratorio, de elevadas concentraciones de angiotensina en el líquido sinovial de una artritis reumatoidea y la demostración que el receptor AT1, induce la liberación de citoquinas proinflamatorias incluyendo el TNF- $\alpha$ , nos condujo a utilizar un modelo de artritis experimental por Carrageena (C) en ratas. Dado que la evolución de la osteoartritis está asociada con los niveles elevados de TNF- $\alpha$  séricos, decidimos estudiar si la C, al ser inyectada intraarticularmente (IA), era capaz de inducir la liberación de All, y si el Losartán inhibía la reacción inflamatoria articular. Ratas Wistar macho fueron inyectadas IP con Losartán (20mg/Kg) o con solución fisiológica, 1 hora antes del desafío con C al 1% y 2% (1ml) IA. Al cabo de 5 horas se tomaron muestras del líquido inflamatorio y se midieron los niveles de All (RIA), TNF- $\alpha$  y mieloperoxidasa (MPO) por ELISA. Concentración de TNF- $\alpha$  ( $\Delta$  absorbancia): 225  $\pm$  32 vs 146  $\pm$  19; MPO: 2017  $\pm$  274 vs. 1518  $\pm$  198, no tratadas vs. tratadas (p<0.05, n=12). Producción de All, C: 989  $\pm$  30 pg/ml vs. tratadas 70  $\pm$  5 pg/ml (p<0.01, n=12). Estos resultados sugieren que el bloqueo del receptor AT1 constituye una nueva estrategia en la terapéutica antiinflamatoria.

## INFECCIOSAS

- 111. Nitrición de proteínas plasmáticas y neutrófilos de pacientes sépticos.** M. Cecilia Carreras, Natalia Riobó, Natalio Baredes, Griselda A. Pargament, Daniela Converso, Carlos G. Del Bosco, Juan J. Poderoso

*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires.*

En los últimos años se ha vinculado al óxido nítrico (NO) y al peroxinitrito con la respuesta inflamatoria y la sepsis, observándose un aumento de los metabolitos del NO (NOx) en pacientes sépticos y una disminución del estallido respiratorio en neutrófilos circulantes de pacientes con falla orgánica múltiple (MODS). Nuestro objetivo fue estudiar una posible relación entre los niveles de nitrición de las proteínas plasmáticas y de los neutrófilos y el grado de severidad de la enfermedad. Se tomaron tres grupos de pacientes: no séptico (C), pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) o con MODS (n=9 por grupo). Los pacientes se clasificaron según los datos clínicos y la evidencia de infección bacteriana o la presencia de un foco séptico, siendo excluidos aquellos tratados con drogas esteroideas o nitroprusiato. Se midieron los NOx plasmáticos por la reacción de Griess y la nitrición por Western y Slot blot con anticuerpos antinitrotirosina. Los valores de NOx fueron: 8  $\pm$  1 (C), 5  $\pm$  1 (SIRS) y 23  $\pm$  5  $\mu$ M\* (MODS) (\*p<0.05). Los niveles de nitrición de los plasmas con MODS fueron superiores a los de los SIRS y controles, observándose dos bandas correspondientes a la albúmina y a una proteína de ~106 kDa. Los neutrófilos circulantes se hallaban más nitrados en los pacientes con MODS. Se concluye que durante la evolución de la sepsis aumenta la nitrición de proteínas tanto plasmáticas como leucocitarias lo cual podría vincularse con alteraciones funcionales.

- 112. Efecto de un inhibidor del óxido nítrico sobre la infección pulmonar con herpes humano en ratón.** Fabián Benencia, Ernesto. J. Massouh

*Laboratorio de Inmunoquímica, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.*

En este trabajo estudiamos el efecto de la aminoguanidina (AMG), un inhibidor del óxido nítrico, sobre la infección pulmonar de ratones Balb/c con Herpes simplex virus tipo 1, cepa F. Grupos de 10 animales cada uno fueron infectados (día 0) intranasalmente con 10  $\mu$ l de una suspensión viral de HSV-1, F, conteniendo 10<sup>7</sup> unidades formadoras de placa/ml (ufp/ml). Los animales fueron anestesiados con eter y la suspensión viral fue depoi-

sitada en las narinas hasta que el inóculo fue totalmente aspirado. Los ratones fueron tratados entre los días -2 a +2 con diferentes concentraciones de AMG (2, 4 y 8 mg/ml; 0.5 ml por vía intraperitoneal). Los animales tratados presentaron una pérdida de peso significativamente mayor que los controles a lo largo de la infección (8 mg/ml, día 7 pi: 30% de pérdida de peso, control: 20% de pérdida de peso, p<0.05). Por otro lado, los grupos tratados con la mayor concentración de AMG presentaron un aumento de mortalidad dependiente de la dosis (día 8 post-inoculación (pi); control y 2 mg/ml AMG: 60%; día 6 pi; 8 y 4 mg/ml: 80%, p<0.05). Los pulmones y los turbinatos nasales de los animales infectados fueron extirpados a distintos días pi. y homogeneizados al 10% en PBS. Las suspensiones obtenidas luego de centrifugar fueron tituladas por el método de unidades formadoras de placa a fin de detectar virus infectivo. Se observó un aumento en el título de virus presente en turbinatos nasales (día 3 pi: control = 1234  $\pm$  323 ufp/ml; 8 mg/ml AMG = 2535  $\pm$  247 ufp/ml; p<0.05; día 5 control: 315  $\pm$  38 ufp/ml; 8 mg/ml = 706  $\pm$  58 ufp/ml, p<0.05) y pulmones (día 3 pi: control = 51638  $\pm$  678 ufp/ml; 8 mg/ml AMG = 105246  $\pm$  1445 ufp/ml; p<0.05; día 5 control: 2317  $\pm$  889 ufp/ml; 8 mg/ml = 8973  $\pm$  359 ufp/ml, p<0.05) de animales tratados. El epitelio bronquioalveolar presentó signos de daño viral y éste fue comparativamente más severo en el grupo de animales tratados con la concentración más alta de AMG. Estos datos indicarían un papel del óxido nítrico en la inmunidad natural hacia el virus Herpes simplex en las infecciones del tracto respiratorio.

- 113. Papel del virus transmitido por transfusiones (TTV) en pacientes de hemodiálisis crónica.** Federico Gómez, Rodolfo Valtuille, Fernando Frankel, Héctor Moretto, Fabián Fay, Leonardo Lef, Pablo Rendo, José Fenández

*Bio Sidus, RTC-Monte Grande, CDM, Buenos Aires.*

El TTV es un nuevo DNA virus hepatotropo, cuyo papel patogénico no ha sido establecido. **Objetivos:** Estudiar la prevalencia de infección y genotipos del TTV en pacientes de hemodiálisis crónica (HDC) y su relación con las características clínicas y epidemiológicas. **Métodos:** En los 75 pacientes de HDC de nuestra unidad se investigó la presencia del TTV por PCR con primers de la región ORF1 descritos por Okamoto, sus distintos genotipos por RFLP por el método de Tanaka y el virus de la hepatitis C (HCV) por PCR. **Resultados:** 32 pacientes (43%) fueron TTV(+). Los genotipos fueron G1: 16, G2 3, G3 1, G4 2, G2+G5 6, no clasificados 4. En 27 pacientes TTV(+) (87%) y 27 TTV(-) (63%) se comprobó el antecedente transfusional (p=0.04). No se hallaron diferencias en relación al tiempo de HDC, la edad o el sexo. Fueron HCV(+) 10 pacientes (13%), 4 de ellos asociados al TTV. Se observó elevación crónica de transaminasas (ECT) en 13% de los pacientes TTV(+) y 9% de los TTV(-) (NS), y en 40% de los pacientes HCV(+) y 8% de los HCV(-) (p=0.003). En 2 pacientes TTV(+) no se halló otra causa que explique la ECT. **Conclusiones:** La prevalencia de la infección por TTV es alta en pacientes de HDC, siendo el genotipo G1 responsable de la mitad de los casos, y se vincula con el antecedente transfusional. La ECT se asocia a la infección por HCV pero no por TTV, aunque en algunos pocos pacientes este podría ser su causa.

- 114. Selectiva influencia del selenio de la dieta en la repercusión miocárdica de la infección viral.** Ricardo Gómez, Orville Levander\*, María Berría

*Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; \*Human Nutrition Research Center, Beltsville, MD, USA.*

Dado que una variante miocárdica de virus Coxsackie B-3 induce lesiones cardíacas mas precoces y severas en ratones selenio-deficientes, el presente estudio se emprendió para determinar si otros virus eran también capaces de provocar una patología cardíaca que fuera influida por el aporte de selenio (Se) en la alimentación. Así, ratones C3H/HeN que desde el destete estaban siendo alimentados con una dieta deficiente o suplementada por selenio, a las 7 semanas de vida fueron inoculados por

vía intraperitoneal con virus coxsackie B1 (CVB1), coxsackie A9 (CVA9), echo 9 (EV9), polio 1 (PV1), cepa GDVII de Theiler (TMEV-GDVII) o cepa XJ-44 de virus Junín (JV-XJ). En los respectivos cortes histológicos de miocardio, el grado de lesión fue calculado por el conteo del número de focos de miocarditis y la estimación de su extensión por el número de fibras miocárdicas involucradas. Los resultados indicaron que CVB1, EV9, TMEV-GDVII y JV-XJ causaron una enfermedad cardíaca más severa en ratones Se (-) con respecto a los animales Se (+), mientras no se encontraron diferencias con CVA9. En cuanto a PV1, como era previsible no indujo patología cardíaca, en tanto que HSV-1 resultó más agresivo en ratones Se (+). Cabe concluir que los niveles de Se en la dieta influyeron selectivamente en la severidad de la miocarditis inducida por diferentes virus.

**115. Expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y superóxido dismutasa citoplasmática (SODc) en la encefalitis experimental por virus Junín.** Ricardo Gómez, Alejandra Yep, María Berría

*Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Ante el creciente interés suscitado por el *stress* oxidativo en la patogenia de la infección viral en SNC, se consideró oportuno evaluar la expresión de la iNOS y la SODc en tejidos neurales de ratones BALB/c inoculados intracerebralmente con  $10^3$  UFP de virus Junín-cepa XJ44. A los 14 y 21-24 días pi se cosecharon encéfalos para su procesamiento por tinciones anilínicas e inmunocitoquímicas. Contrastando con la severa y letal enfermedad neurológica, los signos histopatológicos fueron poco evidentes, a excepción de una difusa astrocitosis evidenciada por la marcación de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP). A la vez, el antígeno viral se detectaba sobre todo en neuronas de corteza, hipocampo, núcleos basales y cerebelo. Aunque la presencia viral estaba mas restringida en astrocitos, fue en ellos donde se observó una aumentada expresión de iNOS, que también fue evidente a nivel de células inflamatorias y de algunas neuronas, incluyendo las Purkinje y las hipocámpicas. En cambio, el incremento de la SODc se observó tanto en células inflamatorias como en endotelio de la microvasculatura cerebral. Si bien la inhibición específica de la iNOS por inoculación intraperitoneal de aminoguanidina no influyó en la supervivencia de los animales, estuvo sin embargo asociada a una menor activación astrocitaria. Los resultados obtenidos señalan al astrocito como una de las principales fuentes de NO y sugieren que la inhibición de iNOS implica una menor respuesta astrocitaria a la injuria.

**115b. Actividad de la DT-diaforasa en el pulmón de ratas sépticas y su modificación por peroxinitrito.** Paola Finocchietto, Francisco Schöpfer, Jorge Peralta, Juan J. Poderoso

*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.*

La DT-Diaforasa (DTD) es una enzima que cataliza la reducción de la ubiquinona (CoQ) a ubiquinol (CoQH<sub>2</sub>) y regenera su capacidad antioxidante. Dado que CoQH<sub>2</sub> es un antioxidante reconocido se propone una nueva acción protectora ante el peroxinitrito: ONOO<sup>-</sup> (factor de daño tisular en el ARDS). El propósito de este trabajo fue observar la actividad en la sepsis post peritonitis fecal y su potencial modificación por el ONOO<sup>-</sup>. En ratas Sprague-Dawley de peso 220-250 g (n=16) se efectuó la ligadura del ciego y doble punción (2CLP) y se obtuvieron muestras de pulmón a las 4 y 16 hs de la 2CLP, y en ratas controles. Los tejidos fueron homogeneizados y se determinó la actividad de la DTD en el sobrenadante a 8000g mediante la reducción de DCPIP por NADPH respecto de la inhibición por dicumarol expresándose en nmoles/min/mg de proteína. In vitro se expuso el sobrenadante de 8000g a cantidades crecientes de ONOO<sup>-</sup> (50-400 μM). Se observó que la actividad de DTD se incrementó en forma significativa (p<0.05, ANOVA, test de Dunnet) a las 4 hs de 2CLP (342 ± 42, n=6 vs controles 92 ± 7, n=4), disminuyendo a las

16 hs de sepsis (185 ± 34, n=4) y fue inhibida por ONOO<sup>-</sup> (IC50=150 μM). Se concluye que la actividad de DT diaforasa en el pulmón aumenta durante la primera fase de la sepsis posiblemente como un mecanismo de protección, pero su actividad puede resultar afectada durante la evolución de la misma por acción del peroxinitrito.

## GASTROENTEROLOGIA II

**116. Daño gastrointestinal inducido por celecoxib y rofecoxib, en ratas.** Oscar Laudanno, José Cesolari, José Esnarriaga, Lucas Rista, Gabriela Piombo, Alicia Godoy, Adriana Rocaspana.

*Gastroenterología Experimental. Cátedras Patología Médica III e Histología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.*

Estudiar AINEs COX-2, Celecoxib (Ce) y Rofecoxib (Ro), en el daño de la mucosa gastrointestinal sana o dañada. Random. ratas Wistar (n=15 c/grupo), 200g, ayuno 24hs, except. agua ad libitum; se realizaron: **Exp I.** 1. Vehic. 1ml orogástrico (OG), c/24hs 5 días. 2. Ce 50-100-200mg/Kg. 3. Ro 5-15-25-50 mg/Kg. 4. Indometacina (In) 60mg/Kg 1 dosis. 5. In 24hs, Ce c/12hs 5 días. 6. In 24hs, Ro c/24hs 5 días. **Exp II.** = I (SC). **Exp III.** Úlcera gástrica ác. acético glacial. 1. 4° al 10° día. Vehic. SC. 2. Ce 50-200mg/Kg. 3. Ro 5-50mg/Kg. **Exp IV.** Úlcera duodeno por Cisteamina (C). 1. C 225mg/Kg SC 1 dosis 5 días. 2. C 24hs., Ce. 3. C, Ro. **Exp V.** Estrés inmovil e inmer. agua 15°C 6hs (E). 1. Vehic. SC 1h, E. 2. Ce, E. 3. Ro, E. Anest. éter, toracoparot., punc. card. y sangre para neutrofilia; gastroenterect. total; % área ulcerosa gástrica y necrot. intest., por planimetría e histolog. (H.E., MPO). Test t student y ANOVA. **Exp IyII.** Ce y Ro 0% (n.s.); en cambio agravaron a In > 50% (P<0.001) con necrosis masiva del I.D. y colon. **Exp III, IV y V.** Ce y Ro amplificación úlceras y sus perforaciones (P<0.001). In, Ce y Ro dieron similares neutrofilias 5.000mm<sup>3</sup> (n.s.); Ce y Ro no infiltración de neutrófilos en mucosa gástrica sana (MPO). Conclusiones: Ce y Ro no provocaron daño en mucosa gastrointestinal sana, y estarían contraindicados en patología gastrointestinal inflamatoria.

**117. Subcultivo y trasplante de hepatocitos de rata adulta normal: detección y caracterización.** Alicia Lorenti, Mariana Barbich, Patricia Sorroche, Esteban Mocetti, Hernán García, Alejandra Hidalgo, Pablo Argibay

*Unidad de Medicina Experimental. Hospital Italiano de Buenos Aires.*

Nuevos enfoques en el tratamiento de la falla hepática fulminante han conducido a la utilización de hepatocitos cultivados, que sean capaces de mantener su viabilidad y funcionalidad tanto in vivo como in vitro. El objetivo de este trabajo fue evaluar la funcionalidad de subcultivos de hepatocitos (hasta 3 pasajes) y la detección y caracterización de células cultivadas e injertadas en retroperitoneo de rata normal. Los hepatocitos fueron aislados por el método de Seglen y cultivados en medio E-Williams suplementado con EGF, BPE, transferrina, insulina, hidrocortisona y antibiótico/antimicrobico. La funcionalidad fue determinada a través de la detección de albúmina (8,02 μg/ml, día 11, pasaje 3) y de MEGX (166,25 ± 0,75 ng/ml, pasaje 1) como marcadores de las funciones de síntesis y de detoxificación respectivamente. Los hepatocitos injertados fueron marcados con DAPI (0,02%) inmediatamente antes del implante. La presencia y viabilidad de células hepáticas fue confirmada con microscopio de fluorescencia (presencia de DAPI) y por inmunomarcación para albúmina, siendo ambas positivas hasta los 66 días pos-implante. La posibilidad de contar con células cultivadas que mantengan la capacidad de adhesión a un sustrato, tanto in vitro como in vivo, así como su viabilidad y funcionalidad, permitirá que estas células puedan ser utilizadas en terapias de trasplante celular, terapia génica o sistemas de hígado bioartificial.

**118. Evaluación de la proliferación y funcionalidad in vitro de hepatocitos normales de rata en un cultivo primario a largo plazo.** Mariana Barbich, Alicia Lorenti, Patricia Sorroche, Esteban Mocetti, Alejandra Hidalgo, Pablo Argibay

*Unidad de Medicina Experimental. Hospital Italiano de Buenos Aires.*

Tanto el trasplante de hepatocitos como los sistemas de soporte extracorpóreo necesitan de una gran cantidad de hepatocitos viables y funcionales, siendo necesario desarrollar y caracterizar sistemas in vitro capaces de cumplir las funciones hepáticas. El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad proliferativa de hepatocitos normales de rata cultivados in vitro por un periodo de 30 días a través de la incorporación de timidina tritiada ( $1\mu\text{Ci/ml}$ ) y en forma paralela midiendo la incorporación de BrdU ( $10\mu\text{g/ml}$ ) en el cultivo por inmunomarcación. Los hepatocitos fueron obtenidos por doble perfusión in vivo, y cultivados en medio E-Williams suplementado con EGF, BPE, transferrina, insulina, hidroclortisona y antibiótico/antimicótico. El SFB inicialmente en un 10 %, se bajó a 1%. al tercer día de cultivo. La marca incorporada revela un pico entre los días 3 y 5; este incremento alcanza su pico máximo el cuarto día (73 veces respecto del día 2). Estos valores se corresponden con la marcación para BrdU donde también se pueden observar figuras mitóticas. La síntesis de albúmina en este sistema se extendió hasta los 35 días, con un pico máximo a los 12 días de  $19,50 \pm 3,77\mu\text{g/ml}$ . El MEGX se pudo evaluar durante 7 semanas, con un pico máximo a las 5 semanas ( $550,15 \pm 44,94\text{ ng/ml}$ ). Estos resultados muestran la posibilidad de tener un sistema in vitro con capacidad proliferativa y funcionalmente activo a largo plazo.

**119. Alteraciones en capilares del hipocampo en ratas hipertensas portales.** Diana Grinson<sup>1</sup>, Andrea Ruibal<sup>1</sup>, Rubén Iacono<sup>2</sup>, Camila Scorticati<sup>3</sup>, Francisco Eizayaga<sup>3</sup>, Abraham Lemberg<sup>3</sup>, Juan Perazzo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Biología Celular e Histología, <sup>2</sup> Instituto de Estudios de Inmunología Humoral (CONICET); <sup>3</sup> Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

En un trabajo previo se encontró en el hipocampo de cerebro de ratas hipertensas portales (HP) prehepáticas la presencia de astrocitosis. Se decidió estudiar los capilares debido a su estrecha relación morfo-funcional con los astrocitos. Para ello se utilizaron ratas Wistar macho divididas en: Grupo I (n=6) HP por estrechez reglada de la vena porta; Grupo II (n=4) ratas simil-operadas y Grupo III (n=6) controles. A los 14 días se sacrificaron extrayéndose el cerebro, que se fijó e incluyó en parafina. En cortes de 4  $\mu\text{m}$ , se midió la expresión de factor von Willebrand de las células endoteliales del área CA4 del hipocampo por inmunohistoquímica (anticuerpo monoclonal-avidina/biotina). Los resultados obtenidos a través del analizador de imágenes mostraron un aumento significativo en el número de capilares por campo: G I =  $3.83 \pm 0.27$  vs G2 =  $2.42 \pm 0.20$  y G III =  $2.67 \pm 0.21$ ,  $p < 0.001$  y un aumento en la intensidad de marca por campo: G I =  $521.6 \pm 87.47$  vs G2 =  $247.57 \pm 38.82$  y G III =  $277.97 \pm 66.03$ ,  $p < 0.001$ ; no registrándose aumento de la intensidad de marca por capilar: G I =  $37.34 \pm 4.32$  vs G2 =  $40.50 \pm 1.63$  y G III =  $36.11 \pm 4.54$ . Se realizó el análisis estadístico por ANOVA y Bonferroni como post-test. Estos resultados muestran que la astrocitosis va acompañada de capilarización en el área CA4 del hipocampo, lo que refuerza la hipótesis de una alteración morfo-funcional en el cerebro de ratas en este modelo de HP.

**120. Efecto de la dapsona (D) sobre la función hepática en la rata.** Luis Veggi, Enrique Sánchez Pozzi, Viviana Catania, Marcelo Luquita, Fernando Crocenzi, Marcelo Roma, José Pellegrino, Aldo Mottino

*Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario*

La D, un fármaco usado en el tratamiento de lepra, malaria, etc., produce alteraciones en el metabolismo hepático de fase I y, ocasionalmente, hepatopatía de origen incierto. En este trabajo, se estudió su efecto sobre la función secretora biliar y sobre el metabolismo de fase II en la rata. Se administró D a ratas macho adultas durante 4 días ( $60\text{ mg/Kg peso/día}$ , i.p.) o propilenglicol (vehículo de D) en los controles. Se estudió flujo biliar, velocidad de excreción y composición de sales biliares (SB) en bilis, actividad de marcadores séricos de daño hepático y de las enzimas de fase II UDP-glucuronosil-transferasa microsomal (UGT) y glutatión S-transferasa citosólica (GST). El flujo biliar ( $\mu\text{l/min/g híg.}$ ) fue disminuido por D ( $1.33 \pm 0.10$  vs.  $1.66 \pm 0.17$ ;  $p < 0.05$ ). La excreción de SB totales no se vio afectada, pero su composición se modificó cualitativamente, conduciendo a un aumento en su índice de hidrofobicidad, referido al colato ( $-0.171 \pm 0.001$  vs.  $-0.410 \pm 0.079$ ;  $p < 0.05$ ). De los marcadores séricos de daño hepático estudiados, sólo la actividad fosfatasa alcalina (U/l) fue afectada por D ( $451 \pm 65$  vs.  $221 \pm 15$ ;  $p < 0.01$ ). La actividad UGT no fue afectada, mientras que GST (sustrato DCNB,  $\text{nmol/min/mg prot.}$ ) fue disminuida por D ( $28 \pm 1$  vs.  $44 \pm 4$ ;  $p < 0.01$ ). La disminución en GST ocurrió a expensas de su contenido en isoformas clase  $\mu$  (analizado por «western blot»). Concluimos que el aumento de la hidrofobicidad del «pool» endógeno de sales biliares y la menor cantidad de GST (encargada de fijar SB, reduciendo su citotoxicidad) podrían contribuir a explicar los efectos deletéreos de D sobre la función secretora hepática.

## ENDOCRINOLOGIA V

**121. Acción de la inhibina (inh) sobre el crecimiento folicular: posible función sobre el proceso de selección del folículo ovárico.** Alejandra Vitale<sup>1</sup>, María Ballerini<sup>2</sup>, Stella Campo<sup>2</sup>, Marta Tesone<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires y <sup>2</sup> Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Buenos Aires.

Uno de los posibles factores autocrinos o paracrinos involucrados en el proceso de selección folicular es la Inh. La Inh es una hormona proteica gonadal que selectivamente inhibe la producción de FSH hipofisaria, está constituida por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) formando la Inh A ( $\alpha\beta\text{A}$ ) y la B ( $\alpha\beta\text{B}$ ). Se ensayó el efecto de distintas concentraciones de Inh A humana recombinante sobre la proliferación, medida por incorporación de timidina<sup>3</sup>H, a células de granulosa de rata (CG) en cultivo. Se estimuló durante 48 hs con FSH ( $20\text{ ng/ml}$ ),  $E_2$  ( $500\text{ ng/ml}$ ) y TGF $\beta$  ( $5\text{ ng/ml}$ ). Se observó inhibición ( $p < 0,05$ ) de la proliferación (Control:  $5543 \pm 146\text{ cpm}$ ; Inh  $4\text{ ng/ml}$ :  $4767 \pm 174$ ; Inh  $40\text{ ng/ml}$ :  $3480 \pm 117$ ). Esto fue confirmado por MTS (Absorbancia= Control:  $1,3 \pm 0,2$ ; Inh  $40\text{ ng/ml}$ :  $0,5 \pm 0,02$ ;  $p < 0,05$ ). Considerando que las CG en cultivo son capaces de producir Inh, ésta se midió en el medio a distintos tiempos del agregado de los estímulos mencionados, observándose a tiempos cortos de cultivo, niveles menores de producción que los capaces de inhibir la proliferación (2hs:  $0,04 \pm 0,003$ ; 4hs:  $0,2 \pm 0,007$ ; 8hs:  $0,7 \pm 0,01$ ; 16hs:  $1,5 \pm 0,04$ ; 24hs:  $3,2 \pm 0,25\text{ ng/ml}$ ). También se ensayó el efecto de activina (otro modulador local) en este sistema, observándose una estimulación significativa de la proliferación celular ( $40\text{ ng/ml}$ :  $47,1\%$ ). Concluimos que las CG del folículo dominante producen Inh que actuaría como factor paracrino inhibiendo el crecimiento de folículos vecinos modulando así el mecanismo de selección folicular.

**122. Estudios moleculares del receptor de FSH en pacientes con síndrome de ovario resistente (SOR) y Falla ovárica prematura (POF).** Violeta Chiauzzi<sup>1</sup>, Liliana Dain<sup>2,3</sup>, Eduardo Charreau<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, <sup>2</sup> Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires, <sup>3</sup> Centro Nacional de Genética Médica (ANLIS), Buenos Aires

Ha sido descrita una mutación inactivante en el exón 7 del gen del receptor de FSH, en familias de Finlandia con falla ovárica de origen autosómico recesivo. La frecuencia de defectos moleculares en el gen del receptor de FSH en pacientes con POF, ha sido escasamente estudiada en otras poblaciones diferentes de la finlandesa. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de mutaciones en los exones 1 y 7 del receptor de FSH, en pacientes con SOR y POF, en nuestra población. Los individuos analizados fueron: 6 SOR, 10 POF, y 42 controles normales con fertilidad comprobada. El ADN fue aislado de linfocitos de sangre periférica y los exones 1 y 7 fueron amplificados por PCR. Para el exón 7, se estudió la mutación C 566T, mediante digestión con la enzima BsmI y los fragmentos obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida. El exón 1 se estudió por SSCP en 3 condiciones de corrida en geles de poliacrilamida y posterior tinción con plata. Los resultados para la mutación C566T fueron: SOR: CC=6/6, CT=0/6, TT=0/6; POF: CC=10/10, CT=0/10, TT=0/10; CONTROL: CC=42/42, CT=0/42, TT=0/42. En los estudios del exón 1 no se observaron patrones de migración anormales al comparar los pacientes POF y/o SOR con los controles. Concluimos que en los estudios realizados no se detectó la mutación inactivante C566T ni cambios en el exón 1 del receptor de FSH descartando la presencia en ambos exones de mutaciones responsables de la etiopatología de ambas enfermedades.

**123. Presencia de mastocitos y expresión de desmina (des) y vimentina (vim) en el cérvix de la rata durante la preñez.** Jorge Ramos, Jorgelina Varayoud, Laura Kass, Hugo Ortega, Mónica Muñoz de Toro, Enrique Luque

*Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.*

El cérvix uterino sufre modificaciones para adaptarse a los cambios biomecánicos de la preñez y el parto. La heparina secretada por mastocitos participa en la diferenciación de fibroblastos. El objetivo fue evaluar en el cérvix de la rata durante la segunda mitad de la gestación días 9 (D9) al 23: a) expresión inmunohistoquímica de des y vim, b) presencia de mastocitos mediante la tinción con alcian blue-safranina. La expresión de des y vim se determinó en dos zonas del cérvix, subepitelial y estroma profundo, por análisis de imágenes expresando los resultados como densidad de superficie (Vv x 100). En la región subepitelial se produce un incremento significativo en la expresión de vim el D17 que se mantiene hasta el parto (D9:  $13.37 \pm 1.53$ ; D17:  $18.28 \pm 1.90$ ; D23:  $18.70 \pm 1.56$ ;  $p < 0.05$ ). En esta región la expresión de des es baja el D9 ( $2.57 \pm 0.50$ ), aumenta los D14 ( $13.27 \pm 0.71$ ) y D17 ( $22.77 \pm 0.40$ ), y se mantiene hasta el D23. ( $26.88 \pm 3.56$ ). En el estroma profundo se observa baja expresión de vim y alta de des, sin distinguirse cambios entre D9 al D23. Los mastocitos se cuantificaron con un ocular con grilla contando el número de intersecciones que caen sobre mastocitos vs el número total de intersecciones que caen en el estroma cervical (Vv). Un número elevado de mastocitos infiltra el cérvix entre el D9 (Vv:  $2.00 \pm 0.85$ ) y el D15 (Vv:  $1.88 \pm 0.79$ ) observándose una disminución significativa desde el D17 (Vv:  $1.03 \pm 0.32$ ,  $p < 0.05$ ) que se mantiene hasta el parto (Vv:  $1.21 \pm 0.38$ ). Los resultados muestran: a) ambos filamentos intermedios aumentan su expresión en la zona subepitelial del cérvix durante la preñez, b) hay células que coexpresan vim y des, c) estos cambios coinciden con menor cantidad de mastocitos infiltrantes. Estudios futuros permitirán definir si hay degranulación de mastocitos asociada a los cambios del estroma cervical.

**124. Evaluación inmunohistoquímica de la proliferación celular en el cérvix uterino durante la segunda mitad de la preñez.** Jorgelina Varayoud, Jorge Ramos, Laura Kass, Hugo Ortega, Mónica Muñoz de Toro, Enrique Luque

*Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.*

El cérvix de la rata experimenta un crecimiento significativo durante la segunda mitad de la gestación. Este aumento de tamaño puede deberse a mayor celularidad y/o procesos de remodelación de la matriz extracelular. El objetivo fue evaluar la proliferación en el cérvix e identificar los subtipos celulares que proliferan. Se tomaron muestras de cérvix de ratas nulíparas preñadas sacrificadas entre los días 9 (D9) hasta el parto (D23). En cortes sometidos a doble inmunomarcación se evaluó incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) como marcador de proliferación, vimentina (vim) y desmina (des) para determinar el inmunofenotipo. Las células se dividieron en: grupo I (vim+ y vim+/des+) y grupo II (des+). La proliferación se evaluó con un ocular con grilla contando el número de intersecciones que caen sobre área BrdU+ vs el número total de intersecciones que caen en las células de los grupos I o II (Vv). Las células del grupo II no mostraron proliferación. Se observó un aumento significativo en la proliferación de las células del grupo I en el D12 (Vv D9:  $0.58 \pm 0.13$ ; D12:  $1.68 \pm 0.15$ ,  $p < 0.05$ ) haciéndose máximo los D14 y D15 (Vv D14:  $4.45 \pm 1.16$ ; Vv D15:  $4.40 \pm 0.91$ ). A partir del D17 la proliferación disminuye significativamente y se mantiene hasta el final de la preñez (Vv D17:  $2.93 \pm 0.30$ ; Vv D23:  $1.61 \pm 0.32$ ). Nuestros resultados muestran que la proliferación de células vim+ y vim+/des+ aportaría significativamente al crecimiento global del órgano durante la preñez.

**125. Cambios del turnover catecolaminérgico hipotalámico y de la corteza cerebral producidos por una dieta carente de proteínas.** Osvaldo J. Ponzo, Dora Rondina, Berta Swarczfarb, Silvia Carbone, Jaime Moguilevsky, Pablo Scacchi.

*Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.*

Anteriormente hemos demostrado que la dieta aproteica (AP) produce un descenso de la concentración hipotalámica de catecolaminas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto que produce la ausencia de proteínas en la dieta sobre el recambio de estas aminas en el hipotálamo anteromedio basal y en la corteza cerebral. Ratas Wistar macho adultas alimentadas previamente durante 21 días con dieta control (Co) ( $n=26$ ) o dieta sin proteína ( $n=26$ ), fueron inyectadas (ip) con  $\alpha$ -metil-p-tirosina (inhibidor de la tirosina hidroxilasa) a una dosis de 400 mg/kg y sacrificadas en dos tiempos diferentes: 120 y 240 minutos posteriores a la inyección. Los animales sacrificados a los 240 minutos recibieron un refuerzo de 100 mg/kg a los 180 minutos de la primera inyección. Un tercer grupo de animales alimentado con cada dieta, fue inyectado solamente con el vehículo, representando estos los valores basales. El turnover hipotalámico de noradrenalina fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) en el grupo AP (Co:  $283,7 \pm 46,72$ ; AP:  $183,57 \pm 34,25$  ng/mg/h). Igualmente, el turnover hipotalámico de dopamina fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) en el grupo AP (Co:  $70,41 \pm 20,09$ ; AP:  $29,17 \pm 8,68$  ng/mg/h). Con respecto al turnover de noradrenalina en corteza cerebral, no se observó un significativo descenso del mismo (Co:  $83,39 \pm 14,34$ ; AP:  $67,95 \pm 15,32$  ng/mg/hs). La desnutrición producida por la ausencia de proteínas en la dieta provoca un descenso de la tasa de turnover hipotalámico de noradrenalina y dopamina, en ratas macho adultas.

**126. Efectos del ayuno e ingesta alimentaria sobre la función hipotálamo-hipofiso-adrenal (HHA) basal y estimulada por hipoglucemia.** Andrés Giovambattista, Andrea Chisari, Eduardo Spinedi

*Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (CIC-CONICET) y Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.*

Nuestro objetivo fue determinar un posible rol modulador de la leptina (LEP) sobre la función HHA durante un estrés hipoglucémico. Se constituyeron grupos de ratones adultos (hembra): 1) alimentados (al) *ad libitum* e inyectados ip con vehículo (V) (al-al-V); 2) ayuno (ay) de 24 hs e inyectados con V, sin dis-

posición de alimento durante los 45 min post-tratamiento ip (ay-ay-V); 3) ay-ay e inyectados con insulina (INS; 0,3 UI/ratón) (ay-ay-INS) y 4) ay de 24 hs y alimentados durante los 45 min post-INS (ay-al-INS). Sacrificados 45 min post-inyección, se dosó en plasma los niveles de glucosa (G; g/l), corticosterona (B; µg/dl), ACTH (pg/ml) y LEP (ng/ml). Se evaluó la expresión del ARNm del receptor de leptina en hipotálamo (OB-RB, UR/HT). El ayuno (ay-ay-V) indujo (significativamente,  $P < 0,05$ ): hipoglucemia ( $0,72 \pm 0,09$  vs.  $1,23 \pm 0,1$  en al-al-V); aumentos de B (de  $11,2 \pm 2$  en al-al-V a  $25,8 \pm 6$ ) y OB-RB (de  $1,4 \pm 0,06$  en al-al-V a  $2,5 \pm 0,07$ ); e hipoleptinemia (de  $4,8 \pm 0,6$  en al-al-V a  $2,3 \pm 0,1$ ). Los efectos periféricos del ay fueron revertidos por 45 min de ingesta de alimento (grupo ay-al-V). La administración de INS revirtió ( $P < 0,05$ ) la sobre-expresión de OB-RB HT en ay-ay (ay-ay-INS:  $1,02 \pm 0,8$  vs. ay-ay-V) y en ay-al (ay-al-INS:  $1,25 \pm 0,1$  vs. ay-ay-V). La estimulación del eje HHA post-INS en ay-ay (ay-ay-INS) (B:  $61,5 \pm 9,2$ ) fue significativamente ( $P < 0,05$ ) abolida por la ingesta alimentaria post-INS (ay-al-INS) (B:  $8,77 \pm 2,1$ ). Estos resultados indicarían probablemente que la falta de respuesta del eje HHA en animales alimentados durante la acción insulínica podría deberse a una compensación parcial de la hipoglucemia y/o a una inhibición de la actividad neuroendócrina como consecuencia del aumento de leptina circulante.

## TUMORES IV

### 127. Modulación del crecimiento y la actividad de metaloproteinasas de matriz (MMPs) mediante el factor estimulante de colonias granulocíticas y macrofágicas (GM-CSF) en un carcinoma mamario murino. Mariano Gabri, Pablo Lorenzano Menna, Alejandra Scursoni, Daniel Gomez, Daniel Alonso

*Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes y Servicio de Patología, Hospital General 'Evita Pueblo' de Berazategui.*

El GM-CSF es una citoquina multipotencial, que estimula la proliferación de varios linajes celulares. Se estudió el efecto del GM-CSF recombinante sobre cultivos de la línea celular F3II de carcinoma mamario, derivada de una población clonal de un tumor espontáneo murino capaz de producir esta citoquina. En concentraciones de 5 a 25 ng/ml el agregado de GM-CSF exógeno estimuló el crecimiento de las células F3II ( $p < 0,01$ ), mientras que resultó inhibitorio en dosis mayores a 50 ng/ml. Mediante ensayos zimográficos y densitometría, se encontró que el GM-CSF aumenta hasta 8 veces la secreción de MMP-9 y MMP-2, enzimas proteolíticas necesarias para la invasión tumoral y metástasis. In vivo, se inocularon  $2 \times 10^5$  células F3II subcutáneas en hembras BALB/c y a los 60 días se efectuó un estudio autopsico completo. Se registraron metástasis pulmonares en el 97% de los animales (34 de 35). La portación tumoral se asoció con un aumento de la celularidad (100%) y de la relación mieloeitroide (10:1) en médula ósea. También se encontraron focos de mielopoyesis ectópica en hígado y esplenomegalia con mielopoyesis masiva en bazo. El diámetro tumoral se correlacionó con el agrandamiento esplénico ( $r=0.464$ ,  $p < 0,01$ ). En el presente modelo, la progresión del tumor mamario estimularía la mielopoyesis debido a la producción de factores hemopoyéticos. Además, el GM-CSF podría modular el desarrollo del tumor y las metástasis por la producción aumentada de MMPs.

### 128. Evolución cariotípica de un adenocarcinoma mamario murino hormono-dependiente. Victoria Fabris, Marina Simian, Claudia Lanari, Susana Merani

*Instituto de Biología y Medicina Experimental; Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Se realizaron estudios citogenéticos de un adenocarcinoma mamario murino hormono-dependiente inducido por acetato de medroxiprogesterona (MPA) en un ratón hembra BALB/c y de cin-

co líneas celulares derivadas a partir del mismo, con el objetivo de analizar el tumor primario y su evolución a través de las líneas celulares establecidas *in vitro*. El número modal del tumor original fue de 38 cromosomas, mientras que el de las líneas celulares (en los repiques 20-25) varió entre 35 y 83 cromosomas (ratón normal  $2n=40$ ). Los marcadores cromosómicos encontrados fueron: dos cromosomas acrocéntricos grandes, con un patrón de bandas G no identificable con los patrones normales, y dos fusiones céntricas ocurridas entre los cromosomas 1 y 10 (observado también por la técnica de FISH) y entre los cromosomas 2 y 17. Estos marcadores estuvieron siempre presentes en todas las metafases del tumor y de las líneas, conservándose en los diferentes pasajes de las mismas. Además de éstos, cada línea presentó marcadores propios, que no se encontraron en el tumor original. Se observó una tendencia al aumento del número de cromosomas y aparición de nuevos marcadores con el aumento de los repiques. Los resultados evidencian que los marcadores comunes no fueron adquiridos *in vitro* en el proceso de inmortalización y su constancia sugiere que podrían ser asiento de funciones esenciales para el mantenimiento del fenotipo neoplásico.

### 129. Receptores de estrógeno tipo alfa (ER $\alpha$ ) y beta (ER $\beta$ ) en adenocarcinomas mamarios murinos progestágeno-dependientes e independientes. Helguero Luisa, Lamb Carolina, Molinolo Alfredo, Lanari Claudia.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires*

El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de ER $\alpha$  y ER $\beta$  por *Western blots* en a) adenocarcinomas mamarios murinos progestágeno-dependientes (PD) y en sus variantes independientes que regresionan con antiprogestágenos y 17- $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) (PI-R) o resistentes al tratamiento (PI-nR), todos ER+; b) líneas celulares derivadas de un tumor PD y una derivada de un tumor PI-R estimulables por  $E_2$ . Usando 2 anticuerpos diferentes para ER $\alpha$ , uno monoclonal y otro policlonal se observó la clásica banda de  $64.9 \pm 0.6$  kDa del ER $\alpha$  y bandas correspondientes a 38, 39, 54 y 56 kDa en los 5 tumores PD, en los 3 PI-R, en los 3 PI-nR y en las 5 líneas celulares estudiadas. No se observaron cambios de intensidad o de posición aparentes entre sí y respecto a los controles positivos: útero, ovario y glándula mamaria. Usando un Ac policlonal de ER $\beta$  se observó una banda de  $52.4 \pm 0.4$  kDa en todos los tumores y en los controles, incluyendo próstata. En las líneas celulares esta banda estaba ausente observándose una banda de 48 kDa. Concluimos que mientras no se encontraron diferencias en la expresión de RE $\alpha$  ni RE $\beta$  entre los distintos tumores con distinta respuesta hormonal se encontró una diferencia de expresión de ER $\beta$  en las líneas celulares que podría estar relacionado con el efecto proliferativo que ejerce el  $E_2$  en las líneas celulares.

### 130. Regulación por el factor de transformación $\beta$ (TGF- $\beta$ ) de la expresión y activación de los componentes del ciclo celular: ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (cdks) e inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (cdkls) en el modelo experimental de adenocarcinomas mamarios murinos hormono-dependientes (HD) e – independientes (HI) inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA). Mariana Salatino, Eduardo Charreau, Patricia Elizalde

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.*

Se investigó el efecto del TGF- $\beta$ , sobre la expresión y activación de ciclinas, cdks y cdkls al inhibir la proliferación inducida por MPA de células ductales C4HD ( $ED_{50}$   $0.26 \pm 0.14$  ng/ml), y el crecimiento autónomo de su variante C4HI ( $ED_{50}$   $0.27 \pm 0.12$  ng/ml) y de células lobulillares HI 60 ( $ED_{50}$   $7.85 \pm 0.25$  ng/ml). Realizando ensayos de Western Blot se vio que TGF- $\beta_1$  inhibió la expresión de ciclina D $_1$  en  $75 \pm 22\%$  y de A en un  $90 \pm 15\%$  en los tres tipos celulares, mientras que la expresión de ciclina D $_2$  dis-

minuyó sólo en C4HD. Los complejos D<sub>2</sub>/cdk4 disminuyeron (80-90%) en todas las células. Para estudiar el rol de D<sub>2</sub> en la proliferación, se bloqueó su expresión usando oligodesoxinucleótidos antisentido (AS) observándose una inhibición dosis-dependiente de la proliferación medida por incorporación de <sup>3</sup>[H]-timidina de células C4HD (ctrol: 7500 ± 600cpm; ASD2= 2µM: 3750 ± 890cpm) y C4HI (ctrol: 28500 ± 8300cpm; ASD2= 2µM: 9500 ± 2500cpm). TGF-β<sub>1</sub> aumentó la expresión (Western Blot) de p21 (80 ± 25%) en los tres tipos celulares, mientras que p27 aumentó sólo en C4HD (40±12%). Al antagonizar TGF-β<sub>1</sub> los efectos del MPA en C4HD, se observó la disminución en la actividad de cdk2 (84 ± 8%) estudiada por ensayos de fosforilación de Histona H1. Existen así, blancos comunes en la inhibición por TGF-β<sub>1</sub> del crecimiento HD y HI. La regulación de D<sub>2</sub> y p27 se requeriría cuando TGF-β<sub>1</sub> antagoniza la proliferación inducida sólo por MPA.

**131. Diferentes respuestas biológicas a TGFβ en un modelo de adenocarcinomas mamarios murinos con diferente capacidad metastásica.** Cecilia Daroqui, Alejandro Urtreger, Guillermo Lanuza\*, Mariana Salatino\*, Patricia Elizalde\*, Lydia Puricelli, Elisa Bal de Kier Joffé

*Area Investigación. Instituto de Oncología "Angel H. Roffo". Universidad de Buenos Aires. \* Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Buenos Aires.*

La pérdida de respuesta a TGFβ en células de estirpe epitelial ha sido asociada al fenotipo maligno. Estudiamos la expresión y función biológica de los TGFβ y sus receptores (TβR) en cultivos primarios del tumor mamario murino M3 y su variante más metastásica MM3. Empleando un bioensayo sobre células reporter Mv1Lu, se determinó que ambos tipos celulares secretan TGFβ, principalmente en forma latente, siendo las células MM3 más productoras (p<0,05). Mediante Western blot (WB) se identificaron las tres isoformas conocidas de TGFβ (1, 2 y 3). M3 y MM3 expresan TβRI y TβRII (WB) y TβRIII (dot blot), siendo su expresión más elevada en las células MM3. Además, mediante incorporación de TdH<sup>3</sup> se determinó que sólo dosis elevadas de TGFβ1 y β2 purificados inhiben significativamente el crecimiento de ambas células, siendo MM3 menos sensible (49 ± 18% en M3 y 29 ± 10% en MM3, con 40 ng/ml β2). También se estudió el efecto de TGFβ sobre la secreción de proteasas asociadas a invasividad tumoral. En células M3, TGFβ inhibe la actividad de uPA medida por caseinólisis radial (46 ± 3 UI/mg prot.cel. en el control vs 22 ± 0,3 con 40 ng/ml β1), mientras que incrementa la de PAI (zimografía reversa) en forma dosis-dependiente. En cambio, el tratamiento con TGFβ no moduló la expresión de uPA y PAI en células MM3. La producción de MMP-9 fue estimulada por TGFβ (zimografía cuantitativa) en ambos tipos celulares (2,4 ± 0,5 UA/mg prot. cel. en M3 sin tratar vs 18 ± 2 y 28 ± 6, tratadas con 4 y 40 ng/ml de TGFβ3, respectivamente). Estos datos sugieren que algunas vías de señalización de TGFβ están alteradas en las células más metastásicas MM3 y que, en nuestro modelo, su funcionalidad podría asociarse con la progresión tumoral.

**132. Mecanismo de inhibición de la apoptosis por el microambiente de la metástasis.** Alejandro Adam, Lydia Puricelli, Elisa Bal de Kier Joffé

*Area Investigación, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Buenos Aires.*

Los factores paracrinos liberados por el órgano huésped de la metástasis pueden influir profundamente en la proliferación y viabilidad de las células metastásicas. En un modelo de adenocarcinoma mamario murino metastásico en pulmón, factores solubles liberados por este órgano estimulan la proliferación e inhiben la apoptosis inducida por Doxorubicina (Dox) *in vitro* y el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica *in vivo*. Se investigó la capacidad del medio condicionado de pulmón (LCM) de inhibir la apoptosis inducida por otros tratamientos y el mecanismo involucrado en esta protección. El LCM fue capaz de inhibir casi completamente la apoptosis inducida por Fas y privación de sue-

ro (90-100%), mientras que medios condicionados obtenidos de otros órganos, como riñón e hígado, no mostraron dicha actividad. El tratamiento con IGF-I ó EGF no modificó la supervivencia luego de la exposición a Dox. Sin embargo, el TGF-β fue capaz de inhibir en un 40% la apoptosis inducida. El tratamiento con Dox duplicó la expresión de Bax, mientras que redujo la expresión de Bcl-2. El LCM promovió la expresión de Bcl-2 mientras que disminuyó en algunos experimentos la expresión de Bax. Notoriamente, la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> no fue modulada por tratamiento con Dox o LCM solos, pero se observó un aumento de cinco veces en su expresión luego del cotratamiento. La gran mayoría de las células metastásicas mueren al cabo de pocas divisiones en aquellos órganos donde no pueden formar metástasis. Estos resultados sugieren que el microambiente generado por el órgano «blanco» podría rescatar de la muerte apoptótica a las células tumorales, y por lo tanto favorecer la formación de la metástasis en este órgano, probablemente a través de la modulación de la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2.

## RENAL

**133. Producción de NO en glomerulos de ratas seniles. Efecto de la inhibición del sistema renina-angiotensina (SRA).** Angélica Muller, Carlos Amorena, Myriam Mac Laughlin

*Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Como parte del proceso de envejecimiento se produce un grado variable de insuficiencia renal crónica (IRC). Los inhibidores del SRA tienen un efecto renoprotector en el desarrollo de la IRC, que podría deberse a un incremento en la producción renal de NO. Evaluamos la producción de NO de glomerulos (G) de ratas seniles y determinamos en que forma los inhibidores del SRA la modifican. Se utilizaron ratas de 3 y 18 meses (m) subdivididas en 3 grupos : control (C), Enalapril (E) y Losartan(L), (E o L 10 mg/kg peso.día en el agua de beber desde el destete). Se obtuvieron G en condiciones de esterilidad, por tamizado diferencial y se incubaron 48 horas a 37 °C en estufa de CO<sub>2</sub>. La producción de NO se determinó por la reacción de Griess en el medio de cultivo. El grupo C 18 m tuvo una producción de NO mayor que el C 3 m: (2.61 ± 0.25 (17) vs 0.96 ± 0.05 (45) nmol/1000G. 48h). El grupo E o L 3 m no presentó diferencias con el C 3 m. En el grupo de ratas de 18 m el tratamiento con E o L aumentó marcadamente la producción de NO: E 18 m: 136.10 ± 4.65 (10), L18 m: 129.5 ± 2.8 (10) y C18m: vs 2.61 ± 0.25 (17) nmol/1000G.48h. **Conclusión:** los nefrones remanentes de ratas seniles presentan un aumento en la producción de NO. El efecto renoprotector del E o L en ratas seniles puede atribuirse, en parte, a un aumento de la producción glomerular de NO. Esta podría ser consecuencia de la disminución de Angiotensina II.

**134. Efectos de la furosemida sobre la capacidad de acidificación urinaria en sujetos normales.** \*Carlos Margulis, #Claudia Silberstein, #Elsa Zotta, #Cristina Ibarra, ##Nesmo Levy Yeyati

*\*Hospital de Clínicas José de San Martín. #Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

La furosemida es un bloqueante del cotransportador Na<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>/K<sup>+</sup> ubicado en la rama ascendente gruesa del asa de Henle y es utilizado para detectar acidosis tubulares distales. En este trabajo se estudió en 22 sujetos normales (C<sub>C</sub>: 110 ± 10ml/min) los efectos de la furosemida luego de una sobrecarga ácida (CINH<sub>4</sub> 0,1g/Kg) y luego de una sobrecarga alcalina (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 5 mEq/Kg). La furosemida en la sobrecarga ácida: no modificó el pH urinario, previamente descendido por el CINH<sub>4</sub> (pH: 5,12 ± 0,12 vs 4,84 ± 0,05, NS); aumentó la excreción urinaria de amonio (O<sub>NH4</sub><sup>+</sup> V) (148 ± 23 vs 49 ± 6 mEq/min)\*; aumentó la acidez titulable (O<sub>AT</sub><sup>+</sup> V) (59 ± 5 vs 25 ± 2 mEq/min)\* y aumentó la excreción de fósforo (O<sub>P</sub><sup>+</sup> V) (132 ± 19 vs 47 ± 6 mg/min)\*. En la sobrecarga alcalina, la furosemida redujo: el pH urinario (7,57 ± 0,08 vs 7,85 ± 0,02);

la concentración del  $\text{HCO}_3^-$  urinario ( $40 \pm 5$  vs  $133 \pm 9$  mEq/l)\* y el gradiente urosanguíneo de  $\text{pCO}_2$  (O-S  $\text{pCO}_2$ ) ( $10 \pm 3$  vs  $25 \pm 3$  mmHg)\*, elevando el cociente O-S  $\text{pCO}_2 / [\text{HCO}_3^-]_u$  ( $0,25$  vs  $0,19$ )\*. \* $p < 0,05$ . Se concluye que la furosemida luego de una sobrecarga ácida no modifica el pH urinario pero aumenta la excreción neta de protones combinados como  $\text{ONH}_4$  V y la  $\text{O}_{AT}$  V. La furosemida en el humano inhibe la reabsorción de  $\text{NH}_4$  en el asa de Henle, como fue demostrado por Good y col. en riñón de rata (Am J Physiol. 247:F35, 1984). Luego de una sobrecarga alcalina se reduce el O-S  $\text{pCO}_2$  y la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  urinario, pero aumenta el cociente entre ambos, lo que sugiere una estimulación de la secreción distal de  $\text{H}^+$ .

**135. PKC- $\zeta$  fosforila la subunidad  $\alpha$  de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa y se asocia con las vesículas de clatrina durante la endocitosis en células epiteliales renales.** Carlos Mendez, Alejandro Bertorello, Ernesto Podestá

*Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Department of Molecular Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Suecia.*

Recientemente se ha demostrado que la inhibición de la actividad de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa (NKA) por dopamina (DA) en células del túbulo proximal renal (PCT) se asocia con un incremento en la endocitosis de la bomba, por un mecanismo regulado por la proteína quinasa C (PKC). El objetivo del presente trabajo ha sido identificar la isoforma de la PKC responsable de este efecto y determinar si ésta fosforila en forma directa la bomba en células OK. La actividad de NKA se determinó mediante el transporte de Rubidio-86. La actividad de la bomba fue inhibida significativamente por DA ( $1 \mu\text{M}$ ) ( $9,8 \pm 1,4$  vs  $6,2 \pm 0,6$  nmol  $\text{Rb}^+$ /mg prot/min para control y DA respectivamente) siendo este efecto bloqueado por un péptido inhibidor específico para PKC- $\zeta$  ( $8,5 \pm 1,4$  vs  $9,6 \pm 0,8$  nmol  $\text{Rb}^+$ /mg prot/min para DA + inhibidor de PKC- $\zeta$  e inhibidor sólo respectivamente). El análisis por western blot demostró la disminución del grado de fosforilación de la subunidad  $\alpha$  de la NKA por DA (85%) en presencia del inhibidor. Asimismo se demostró la presencia de la isoforma PKC- $\zeta$  en vesículas de clatrina cuando las células se incubaron en presencia de  $1 \mu\text{M}$  de DA. Nuestros resultados indican que el efecto inhibitorio de la DA sobre la NKA en PCT es mediado por la fosforilación de la unidad catalítica por PKC- $\zeta$  y la consecuente internalización del complejo NKA/PKC- $\zeta$  a las vesículas de clatrina.

**136. Metabolización de dopamina a lo largo del nefrón.** Fernando Ibarra, Inés Armando, Andrea Carranza, Marta Barontini, Elvira Arrizurieta, \*Anita Aperia

*Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Universidad de Buenos Aires; Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET, Buenos Aires; \*Karolinska Institutet, Sweden.*

El objetivo de este trabajo es determinar los niveles basales de DA y examinar las enzimas involucradas en su metabolis-

mo en distintos segmentos del nefrón. A partir de nefrones de rata, se microdisecaron túbulos contorneados proximales (TCP), asas gruesas ascendentes de Henle (AGH) y conductos colectores medulares (CM) que luego fueron incubados con diferentes drogas ( $37^\circ\text{C}$ , 15 min). Los niveles basales de DA fueron más altos en TCP ( $10 \pm 3$  pg/mm) y en CM ( $11 \pm 4$  pg/mm) que en AGH ( $5 \pm 1$  pg/mm). En segmentos incubados con DA ( $5 \times 10^{-6}\text{M}$ ), la DA remanente fue similar en TCP ( $67 \pm 13\%$ ) y en CM ( $65 \pm 15\%$ ) y más baja en AGH ( $47 \pm 7\%$ ), sugiriendo que AGH es el principal sitio de metabolización de DA. La inhibición de la actividad de MAO por agregado de Pargilina ( $10^{-3}\text{M}$ ) no modificó significativamente la DA remanente ni la DA basal en CM y AGH pero la incrementó en TCP ( $95 \pm 10\%$ ) sugiriendo que la DA es metabolizada principalmente por MAO en TCP. La inhibición de la actividad de COMT por agregado de Nitecapone ( $10^{-3}\text{M}$ ) no modificó significativamente la DA remanente en TCP pero la incrementó en AGH ( $97 \pm 10\%$ ) y en CM ( $91 \pm 15\%$ ), sugiriendo que en AGH y CM la DA es metabolizada principalmente por COMT. Estos resultados muestran que 1) la DA está presente a lo largo del nefrón de la rata, 2) la DA es metabolizada por diferentes enzimas en diferentes segmentos del nefrón y 3) se propone al AGH como el principal sitio de metabolización de la DA.

**137. Efectos de distintos tiempos de isquemia unilateral sobre la función del riñón postisquémico de rata.** Gabriela Coux, Laura Trumper, María Mónica Elías

*Area Farmacología. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.*

Hemos informado que 5 ó 40 min de isquemia renal unilateral inducen una disminución en la actividad de fosfatasa alcalina (FA) en membranas apicales, mientras que 40 min disminuyen además la actividad de ATPasa Na/K en membranas basolaterales proximales. Nuestro objetivo fue analizar los efectos que las alteraciones instaladas durante 5 y 40 min de isquemia inducen en la función renal después de 1h de reperusión. Luego de canalizar arteria y vena femorales, se obstruyó la arteria renal derecha durante el período deseado. Se liberó la obstrucción y se reperfundió 1 h, durante la cual se cateterizó el uréter derecho. Se estudiaron 2 períodos de Clearance. Se midió la actividad de FA en orina. Se realizaron controles adecuados (C). 5 min de isquemia no produjeron alteraciones en la función medida ni en la excreción de FA. 40 min de isquemia (I40) produjeron alteraciones en la VFG (C= $1,16 \pm 0,05$ , I40= $0,17 \pm 0,11^{**}$  ml/min.g tej); en el clearance de PAH (C= $6,1 \pm 1,0$ , I40= $0,82 \pm 0,6^{**}$  ml/min.g tej) y en la excreción fraccional de  $\text{Na}^+$  (C= $0,3 \pm 0,02$ , I40= $11 \pm 3\%$ ). La excreción de FA aumentó (C= $1,1 \pm 0,3$ , I40= $19,3 \pm 3,4^{**}$  UI/mg Inulina). 5 min de isquemia no producirían alteraciones que afecten los parámetros evaluados de función renal o éstas serían rápidamente reversibles. La alteración en la excreción fraccional de  $\text{Na}^+$  después de 40 min coincide con la inhibición de la actividad de ATPasa Na/K descrita anteriormente. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs control.