

RESUMENES DE LAS COMUNICACIONES

COMUNICACIONES EN POSTERS

ENDOCRINOLOGIA I

1. Efectos óseos de la hormona de crecimiento (HC) en ratas hipofisectomizadas. Sara Feldman, Gustavo Cointry, Roberto Gordon, José Ferretti.

Cátedra de Química Biológica y Centro de Estudios de Metabolismo Fosfo-Cálcico, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. (gcointy@arnet.com.ar)

Hemos analizado tomográfica (pQCT) y mecánicamente (test de flexión) los efectos de la HC en diáfisis femorales y gastrocnemios de ratas adultas Sprague-dawley hipofisectomizadas sin tratar o tratadas con 30 ó 150 mUI/d sc de HC por 45 días (n=5,8,8). La HC aumentó el perímetro perióstico (no el endóstico), el área, el contenido y la densidad mineral (no la rigidez intrínseca) del hueso cortical, y el peso del gastrocnemio, con efecto dosis-respuesta ($p < 0.05$ a $p < 0.001$). Los momentos de inercia (indicadores del diseño diafisario) para flexión y torsión aumentaron hasta 50% ($p < 0.001$), con mejora paralela de la rigidez y la resistencia diafisarias ($p < 0.05$), independientemente de la calidad mecánica del tejido. La influencia del aumento de masa muscular sobre la resistencia ósea decreció con la dosis. Los efectos indican un incremento de masa ósea con mineralización normal o algo aumentada, de calidad mecánica normal, depositada principalmente sobre el periostio, con mejora del diseño, la rigidez y la resistencia de las diáfisis, en relación con la dosis. La influencia decreciente del crecimiento del gastrocnemio sobre la estructura ósea sugiere una alteración de las interacciones biomecánicas músculo/hueso, quizá porque la masa y la fuerza muscular no aumentaron paralelamente.

2. Influencia de la fotoinhibición sobre la población tirotrópica en hamster golden macho. Susana Jurado¹, Gloria Cónsole¹, Mónica Carino¹, Ricardo Calandra^{2,3}, Karina Zitta³, César Gómez Dumm¹.

Cátedra de Histología «B», Facultad de Ciencias Médicas. Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas². Universidad Nacional de La Plata. Instituto de Biología y Medicina Experimental³. (e-mail gconsole@atlas.med.unlp.edu.ar)

Los fotoperíodos cortos provocan una inducción de la actividad pineal con atrofia de los órganos reproductivos. En el presente estudio se investiga el efecto de la privación de luz sobre la población tirotrópica adenohipofisaria. Grupos de 9 hamsters machos fueron mantenidos desde el nacimiento en fotoperíodos largos (FL: 14hs luz, 10hs oscuridad) o expuestos a fotoperíodos cortos (FC: 6hs luz, 18hs oscuridad) durante 8, 16, 22 y 28 semanas. Las hipófisis se procesaron para microscopía de luz y electrónica. Los cortes histológicos se inmunomarcaron mediante anti-TSH-EnVision (Dako)-DAB. Se registraron los parámetros estereológicos por medio de un analizador de imágenes (Optimas). La densidad de volumen ($DV \times 10^{-2}$) y la densidad de células ($DC \times 10^{-4}$) no presentaron cambios significativos en los grupos FC de 8, 16, 22 y 28

semanas respecto a los FL. La ultraestructura mostró disminución de los gránulos secretorios y aumento del RER-Golgi, en el grupo FC.

TSH	FL				FC			
	8s	16s	22s	28s	8s	16s	22s	28s
DV	0.8±0.1	1.0±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	1.0±0.1	0.9±0.2	0.6±0.2	0.6±0.1
DC	0.9±0.2	1.1±0.1	0.8±0.3	0.7±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1	0.7±0.2	0.7±0.1

Concluimos que el estudio inmunohistoquímico no detectó alteraciones histométricas en la población tirotrópica, mientras que los hallazgos ultraestructurales permitirían inferir cambios indicadores de mayor actividad secretoria.

3. Efectos de la privación de luz sobre la población corticotropa en hamster golden macho. Gloria Cónsole¹, Susana Jurado¹, Ricardo Calandra^{2,3}, Gisela Camihort¹, Mónica Carino¹, César Gómez Dumm¹.

Cátedra de Histología «B», Facultad de Ciencias Médicas¹. Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas². Universidad Nacional de La Plata. Instituto de Biología y Medicina Experimental³. e-mail: gconsole@atlas.med.unlp.edu.ar

El hamster golden macho muestra variaciones en las respuestas endocrinas frente a los cambios fotoperiódicos. En el presente estudio se investiga el efecto de la privación de luz sobre la población corticotropa adenohipofisaria. Grupos de 9 hamsters machos fueron mantenidos desde el nacimiento en fotoperíodos largos (FL: 14hs luz, 10hs oscuridad) o expuestos a fotoperíodos cortos (FC: 6hs luz, 18hs oscuridad) durante 8, 16, 22 y 28 semanas. Las hipófisis se procesaron para microscopía de luz y electrónica. Los cortes histológicos se inmunomarcaron mediante anti-ACTH-EnVision (Dako)-DAB. Se registraron los parámetros estereológicos por medio de un analizador de imágenes (Optimas). La densidad de volumen ($DV \times 10^{-2}$) y la densidad de células ($DC \times 10^{-4}$) no presentaron cambios significativos en los grupos FC de 8, 16, 22 y 28 semanas respecto a los FL. A nivel ultraestructural, se observó un RER irregular y considerablemente dilatado en el grupo FC.

	FL				FC			
	8s	16s	22s	28s	8s	16s	22s	28s
DV	4.8±0.7	3.9±1.1	4.4±0.4	4.2±0.6	4.3±0.9	4.1±0.8	3.2±0.5	4.0±0.3
DC	5.2±0.9	4.3±0.8	4.8±0.5	4.6±0.6	4.7±0.5	4.5±0.1	3.5±0.4	4.4±0.4

Concluimos que el estudio inmunohistoquímico no detectó alteraciones cuantitativas en la población corticotropa, hallándose signos ultraestructurales de hipersecreción.

4. Diferencias fenotípicas en ratas de dos líneas con diabetes genética detectadas mediante técnicas multidimensionales. Silvana Montenegro, Fernanda Méndez, Nora Figueroa, Nerina Azpeitia, Juan C Picena, Stella Martínez, María C Tarrés.

Facultad de Ciencias Médicas. Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario. Programa

Interdisciplinario de Análisis de Datos. Universidad Nacional de Rosario. mctarres@rsinternet.com.ar (Presentado por Sara Weinschelbaum- Jairala)

Con el fin de realizar un análisis genético multidimensional en las líneas de ratas diabéticas eSS y eSMT, generadas en nuestro laboratorio, se aplicó el análisis factorial de correspondencias múltiples sobre una matriz de datos constituida por 551 individuos y 13 variables: línea, mes y peso al nacimiento, tamaño de camada, peso al destete, mes y biomasa al realizar las determinaciones de glucemia (G0) e insulinemia (I0) de ayuno, glucemias a los 30 (G30) y 60 (G60)min de sobrecarga oral con glucosa y glucemia (G120) e insulinemia (I120) tras 120 min de la sobrecarga. La edad de los animales, de sexo masculino, fue de 190 ± 24 días. Para efectuar el análisis factorial se recodificaron las glucemias en 4 categorías, siguiendo la categorización de la Asociación Americana de Diabetes (1998). Aplicando las técnicas de clasificación sobre las coordenadas de los individuos en los ejes factoriales se llegó a la conformación de una tipología basada en dos clusters con características diferentes entre sí. La clase I incluye el 49.55% de los individuos y está formada por animales con glucemias compatibles con intolerancia glucídica, principalmente de la línea eSS, con peso (317 ± 40 g), insulinemia (I0: 19 ± 4 , I120: 23 ± 7 uUI/ml) y tamaño de camada (9.12 ± 2.29) significativamente menores al promedio general. La clase II está constituida mayoritariamente por ratas eSMT, con glucemias indicadoras de diabetes franca y biomasa (369 ± 38 g), insulina (I0: 32 ± 9 , I120: 37 ± 8 uUI/ml) y tamaño de camada (10.49 ± 2.54) superiores al promedio general. Esta clara configuración espacial de los individuos permitió detectar, en forma multidimensional, diferencias fenotípicas entre ambas líneas genéticas.

5. La termogénesis en grasa parda expuesta al frío en forma crónica no requiere hormona tiroidea. Inés Rebagliati, Marcela Raíces, Conrado Ricci, Angel Zaninovich.

Conicet, Hospital de Clínicas e Ingebi. Buenos Aires. azaninovich@sinectis.com.ar

La triiodotironina (T3) es esencial para la respuesta termogénica de la grasa parda (BAT) al frío agudo, al potenciar la síntesis de la proteína desacoplante. Las ratas con hipotiroidismo (H) mueren por hipotermia luego de pocas horas de exposición al frío. En cambio, en ratas normales (N) expuestas al frío crónico, la inducción de H en el frío no afecta la sobrevivencia. El presente trabajo midió el consumo de oxígeno (cO_2) en mitocondria de BAT y músculo esquelético. Ratas Wistar macho fueron puestas a 4°C durante 3 meses. Luego, se indujo el H mediante ^{131}I en la mitad de los animales. Ambos grupos continuaron en el frío por 2 meses más. La sobrevivencia de las ratas con H fue normal. Se extrajo BAT y músculo esquelético en cada rata. El peso del BAT fue de 463 ± 45 mg en ratas N ($n=6$) y 643 ± 37 mg en ratas H ($n=6$) ($P < 0.001$) (a 22°C el peso del BAT es de ~ 150 -200 mg). En ratas N, el cO_2 mitocondrial en BAT fue de 427 ± 31 ng átomos $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteína (unidades) y en ratas H fue de 392 ± 27 unidades. En músculo de ratas N, el cO_2 mitocondrial fue de 193 ± 10 unidades y en ratas H 140 ± 8 unidades ($P < 0.001$). La hormona tiroidea no es esencial para el trofismo y la termogénesis del BAT adaptado al frío crónico, mientras que lo opuesto ocurre en el músculo.

6. La privación materna temprana y la lesión del NADT provocan alteraciones en el eje Hipófiso-Adrenal. Marta Suárez, Angélica Rivarola, Sandra Molina, Norma Perassi, Gloria Levin y Ricardo Cabrera.

Instituto y Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. e-mail: msuarez@mater.fcm.unc.edu.ar

El eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal (HHA) es regulado por estructuras límbicas, entre ellas, el núcleo Anterodorsal Talámico

(NADT), el cual ejerce una influencia inhibitoria en la actividad del eje HHA tanto en condiciones basales como en situaciones de estrés agudo en ratas. En el presente trabajo se investigó si la privación materna neonatal (DM) produce cambios en la regulación que el NADT ejerce sobre la actividad del eje HHA. La privación materna de 4,5 hs diarias en las tres primeras semanas de vida, produjo en ratas hembras a los 3 meses de edad, una disminución en la concentración de ACTH plasmática ($p < 0.001$) y un incremento en corticosterona plasmática (C) ($p < 0.001$) comparadas con ratas criadas con la madre (CM). La privación materna también provocó un aumento en Norepinefrina (NE) (66.6%) ($p < 0.001$) y Epinefrina (E) plasmáticas (19%) comparado con ratas CM. A los 30 días de la lesión del NADT, los niveles de ACTH fueron mayores que sus controles (falsamente lesionados) en ambos grupos CM ni DM. La C aumentó en CM, mientras que en DM disminuyó en comparación a las controles ($p < 0.05$). En DM, los niveles de NE y E en ratas con lesión del NADT aumentaron comparadas con sus controles ($p < 0.001$). En conclusión la privación materna temprana induce a alteraciones en el eje HHA y sobre la médula adrenal, aumenta la actividad simpática y afecta la influencia inhibitoria del NADT sobre ACTH y glándula adrenal.

7. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL) en una familia con diagnóstico de feocromocitoma familiar. Gabriela Sansó¹, Horacio Domené¹, Eduardo Pusio², Marta Barontini¹.

CEDIE, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Endocrinología, Buenos Aires¹. Instituto de Patología Tiroidea, Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Mendoza, Argentina².

La enfermedad de VHL es un síndrome neoplásico autosómico dominante caracterizado por el desarrollo de tumores en: riñón, glándula adrenal, SNC, ojos, páncreas y epidídimo. El objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia de mutaciones en la línea germinal del gen *vhl* en una familia con diagnóstico de feocromocitoma familiar, para descartar el diagnóstico de VHL e identificar los portadores asintomáticos. En una familia compuesta por 14 individuos, 3 generaciones, 2 primos hermanos presentaron feocromocitoma bilateral y posteriormente 1 de ellos tumor cerebral. El estudio familiar reveló la presencia de feocromocitoma, tumor cerebral y hemangioblastoma en 3 individuos. El estudio molecular se realizó en 8 miembros. El ADN extraído de SP fue amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos correspondientes al exón 3 del gen *vhl*. Se utilizó secuenciación y restricción enzimática para detectar la presencia de mutaciones. En 5/8 miembros estudiados se detectó una mutación puntual en forma heterocigota, en el codón 238 del exón 3 del gen de *vhl* (CGG@TGG, Arg@Trp). Esta mutación fue confirmada por digestión enzimática con Msp I. Estos resultados confirman la importancia de estudiar el gen VHL en pacientes con feocromocitoma para su correcto diagnóstico y en consecuencia identificar familiares asintomáticos en riesgo de desarrollar la enfermedad realizando el seguimiento adecuado para detectar precozmente los otros componentes del síndrome.

8. Estudios sobre la acción del triiodotiroacético (TRIAC), sobre el crecimiento tiroideo y sus efectos periféricos. Andrea Randi¹, Laura Alvarez¹, Guillermo Juvenal², Susana Hernandez¹, León Krawiec², Pablo Hock³, Mario Pisarev^{1,2}, Diana Kleiman¹.

¹ Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, ² Unidad Actividad Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica, ³ Instituto de Biología y Medicina Experimental. (dkleiman@fmed.uba.ar).

El triiodotiroacético (TRIAC), es un derivado de triiodotironina (T_3) que ha sido propuesto para tratar el bocio eutiroideo. Se investigó el efecto del TRIAC sobre el crecimiento tiroideo y

sus efectos periféricos en hígado de rata. Se indujo bocio con metilmercaptoimidazol (MMI) 5mg/100g p.c./d, i.p., en ratas Wistar hembras y simultáneamente se trataron con diferentes dosis i.p. de TRIAC (prevención del bocio). La relación peso de tiroides/p.c. (T/P) aumentó 100% ($p < 0,001$ vs C) con MMI. Dosis crecientes de TRIAC (12, 25, y 100 g/100g p.c) disminuyeron significativamente la relación T/P (12: 41%, y 25 y 100: 100% $p < 0,001$) vs MMI. La TSH sérica aumentó 169 % ($p < 0,01$) con MMI, y todas las dosis de TRIAC la revertieron a valores normales. Todas las dosis de TRIAC aumentaron la actividad de la enzima málica 2 veces ($p < 0,01$) respecto al MMI. La glicerol-3-P-deshidrogenasa, aumentó 42% y 52% ($p < 0,001$) con TRIAC 25 y 100 vs. MMI. El TRIAC 25 administrado durante 7, 15 y 30 d. a ratas con bocio inducido (involución), disminuyó la relación T/P a partir de los 15 días. La ornitina decarboxilasa, aumentó 139% ($p < 0,05$) por el MMI y se inhibió 53% ($p < 0,05$) con TRIAC 25. Estudios in vitro: En cultivos primarios de tiroides bovina el TRIAC 10^{-8} M disminuyó 42% ($p < 0,001$) la captación de glucosa. Conclusión: el TRIAC tendría un doble mecanismo de acción sobre la tiroides: 1) inhibición del crecimiento vía pituitaria; 2) directo sobre el transporte de glucosa.

9. Efecto inhibitorio de anandamida sobre la secreción de prolactina. ¹Claudia Mohn, ¹Florencia Coria, ²Alejandro Lomniczi, ¹Elisa Cebral, ³Andrea De Laurentiis, ³Adriana Seilicovich, ¹Valeria Rettori.

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos CONICET. Cátedra de Fisiología Facultad de Odontología y ³Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. e-mail: cmohn@cefybo.edu.ar

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la anandamida (AEA), un canabinoide endógeno, sobre los niveles de prolactina plasmática (PRL). Se utilizaron ratas macho adultas Sprague Dawley canuladas en el ventrículo lateral cerebral (icv) (método estereotáxico) y la arteria yugular. AEA icv (20ng/5µl de sol. fisiol.) disminuyó la secreción de PRL medida por RIA [AEA: área 149,5±31,6 ng/ml/90min, control (C)(5µl sol.fisiol.): 334,6±42,3 ($p < 0,005$) (7-9 ratas por grupo)]. Dado que la liberación de PRL hipofisaria se encuentra bajo regulación inhibitoria de la dopamina (DA) hipotalámica (HMB), se determinó el contenido de DA en HMB (por HPLC). AEA icv indujo un aumento de DA [AEA: 17,15±0,85 ng DA/mg prot., C: 7,98±0,26 ($p < 0,0001$)]. En estudios "in vitro" con explantes hipotalámicos, AEA 10^{-9} M aumentó tanto la liberación de DA [AEA: 1,21±0,28 ng DA/2HMB/30min., C: 0,37±0,1 ($p < 0,01$)] como la relación DOPAC/ DA [AEA: 0,39 ± 0,035, C: 0,2 ± 0,03, ($p < 0,001$)]. Estos resultados indican que la anandamida inhibiría la secreción hipofisaria de PRL por un aumento en la liberación de DA hipotalámica.

10. Farmacocinética de la Hormona de Crecimiento (HC) en la rata. Rodolfo Puche, Alfredo Rigalli e Hilda Abranzon.

Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Ciencias. Médicas, Rosario. e-mail: rpuche@unrctu.edu.ar

Estos experimentos se llevaron a cabo con el objeto de definir la vía más eficiente de administración de HC. La HC se administró por vía endovenosa HC a ratas hembra de 150-160 gramos de peso, anestesiadas con uretano, por medio de un catéter insertado en la arteria femoral. Las muestras de sangre se obtuvieron a diferentes tiempos, por otro catéter insertado en la vena femoral. La concentración de HC en el plasma fue medida por IRMA. La concentración de la hormona a tiempo cero es una función lineal de la dosis (1 a 53 ug de HC, iv) que implica un espacio de distribución de 51 ml para una rata de 150 gramos. Con dosis de HC (1-5 ug) que no superaran una concentración inicial de 150 ug/L, la hormona desaparece de la circulación con un tiempo de vida media de 16±2 minutos. Con dosis más elevadas (13-52 ug) la concentración inicial supera los 250 ug/L. En estos casos apare-

ce un primer compartimiento de hormona que decae ($T_{1/2}$ aprox. 180 min) hasta que la concentración se reduce a 150 ug/L, a partir de la cual decae con una media de 16±3 minutos. Se compararon las curvas de concentración de HC en función del tiempo (12 horas) después de inyectar 1 ug de la hormona por vía ev ó 1.3 mg por vía sc. Las áreas bajo las curvas (147.2 vs. 18.0 ug/L.h) indican una severa reducción (del orden de 10.000:1) de la biodisponibilidad de la hormona al inyectarla por vía sc. Se desconoce el mecanismo implicado en este fenómeno. La administración de 1.3 mg de HC por vía ip redujo aun más la biodisponibilidad de la hormona.

11. Efectos del lipopolisacárido (LPS) y de la bicuculina (BIC) sobre la secreción de LH inducida por estradiol-progesterona (E,P). Ana Sánchez, Berta Swarczfarb, Jaime Moguilevsky, Pablo Arias.

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA

Objetivos: evaluar el efecto del tratamiento con LPS sobre la secreción de LH inducida por E2P, y su posible mediación por mecanismos GABAérgicos. **Materiales y métodos:** ratas Wistar ovariectomizadas tratadas con E2 (100 ug/kg s.c.) y P (1 mg/kg s.c.) fueron implantadas con una cánula yugular. Durante 4 horas tras la inyección de P se extrajeron muestras de sangre para la medición de LH. Antes y 120 min después de iniciar la recolección de sangre los animales recibieron (por vía i.v.): vehículo (grupo E2P, n= 5), LPS (250 ug/kg; grupo LPS, n= 6); BIC, un antagonista GABA-A (1 mg/kg, grupo BIC, n= 6) o LPS + BIC (grupo LPS/BIC, n= 7). Los niveles de LH fueron medidos en muestras de suero por RIA (doble anticuerpo, RP2). Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA y el test post-hoc de Tukey ($p < 0.05 = n.s.$). **Resultados:** la secreción de LH inducida por E2P, cuantificada como área bajo la curva (AUC) fue de 9025 ± 781 ng/ml x 240 min (grupo E2P). El tratamiento con LPS indujo una disminución significativa de este parámetro (4927 ± 965 ng/ml x 240 min; $p < 0,05$), no observándose un efecto significativo en los animales tratados con BIC (AUC= 5449 ± 1152 ng/ml x 240 min). Finalmente, los animales tratados con BIC + LPS mostraron un incremento de la secreción de LH (8668 ± 854 ng/ml x 240 min), en relación a aquellos que recibieron LPS. **Conclusión:** el tratamiento con LPS tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de LH inducida por E2P (feedback positivo). La recuperación de la secreción de LH bajo LPS + BIC indica que este efecto estaría mediado, al menos en parte, por un mecanismo GABAérgico.

12. Inmunohistoquímica cuantitativa y ultraestructural de la población somatotropa en hamster golden macho en fotoperíodo corto. Gisela Camihort¹, Susana Jurado¹, Celia Ferese¹, Mónica Carino¹, Ricardo Calandra^{2,3}, Karina Zitta³, Gloria Cónsole¹.

Cátedra de Histología «B», Facultad de Ciencias Médicas¹. Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas². Universidad Nacional de La Plata. Instituto de Biología y Medicina Experimental³. e-mail: gconsole@atlas.med.unlp.edu.ar

La exposición de los hamsters golden a fotoperíodos cortos (<12.5hs) determina una temprana regresión de los órganos reproductivos, con una recrudescencia espontánea. Se investiga el efecto de la privación de luz sobre la población somatotropa adenohipofisaria. Grupos de 9 hamsters machos fueron mantenidos desde el nacimiento en fotoperíodos largos (FL: 14hs luz, 10hs oscuridad) o expuestos a fotoperíodos cortos (FC: 6hs luz, 18hs oscuridad) durante 8, 16, 22 y 28 semanas. Las hipófisis se procesaron para microscopía de luz y electrónica. Los cortes histológicos se inmunomarcaron mediante anti-GH-EnVision-DAB. Se registraron los parámetros estereológicos por medio de un analizador de imágenes (Optimas). La densidad de volumen (DV $\times 10^{-2}$) y la densidad de células (DC $\times 10^{-4}$) no presentaron alteraciones significativas en FC-FL. En FC, la ultraestructura mostró

moderado número de gránulos secretorios e imágenes de RER dilatado, con contenido ligeramente denso.

GH	FL				FC			
	8s	16s	22s	28s	8s	16s	22s	28s
DV	9.1±0.5	9.5±0.8	12.4±0.4	13.2±0.5	12.4±0.9	8.9±0.4	13.6±0.9	10.6±0.8
DC	10.2±0.9	10.6±0.8	13.8±0.5	14.8±0.6	13.9±0.5	10.0±0.1	15.2±0.4	11.9±0.4

En FC, el estudio inmunohistoquímico cuantitativo no detectó cambios significativos, mientras que a nivel ultraestructural se observaron discretos cambios sugestivos de un aumento de la actividad secretoria de GH.

ONCOLOGIA I

13. Acción de la Indometacina sobre el desarrollo del tumor de pulmón murino P07. Guillermo Peluffo, Isabel Stillitani, Miriam Diamant, Alejandro Urtreger, Slobodanka Klein.

Área Investigación, Instituto de Oncología "A.H. Roffo", Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. *Bioterioroffo@yahoo.com. Fax: 4580-2811*

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de un AINE, Indometacina (Indo), sobre el desarrollo in vivo e in vitro de las células de tumor de pulmón murino P07, su efecto sobre las metástasis y los síndromes paraneoplásicos que presentan los portadores de este tumor. Se realizó el tratamiento oral con Indo (10 ug/ml) a) pre (n=10) y b) post-transplante (n=10) s.c. tumoral y se evaluó crecimiento, incidencia de metástasis espontáneas y experimentales, calcemia y caquexia (peso). **Resultados:** El tratamiento con Indo pre y post-transplante no afectó el crecimiento del tumor primario, inhibió significativamente el número de metástasis por ratón (a: 2.9±1.1 y b: 4.3 ± 1.5 vs control: 10 ± 2.7, p=0.000) y no disminuyó el n° de metástasis experimentales (n >100/pulmón). El tratamiento pre-transplante previno el desarrollo de caquexia (22.2 ± 0.9 vs control 20.7 ± 1.1 g, p= 0.004). El tratamiento con Indo no revirtió la hipercalcemia en ninguno de los grupos experimentales. Se evaluó citotoxicidad específica de linfocitos de bazo de portadores avanzados sobre células P07 por ensayo de MTS. La preestimulación en medio con Indo 2uM aumenta el % de citotoxicidad de 21 ± 8 a 100 ± 4. **Conclusión:** La Indo disminuye el desarrollo de metástasis pulmonares espontáneas, no así las experimentales. La inhibición de la síntesis de PGE2 estaría afectando los primeros pasos de la cascada metastásica, la leucocitosis y la caquexia. Estimula los linfocitos esplénicos en una respuesta de citotoxicidad específica no descartándose una actividad del sistema inmune sobre las células tumorales en circulación.

14. Ciclina D1 y p16: Proteínas reguladoras del ciclo celular como marcadores en cáncer de mama. María del Carmen C Vidal¹, María Giselle Peters¹, Liliana Giménez², Eduardo Armanasco², Carlos Cresta², Patricia Elizalde³, Elisa Bal de Kier Joffé¹ y Lydia Puricelli¹.

Área de Investigación. ²Servicio de Patología Mamaria. Instituto de Oncología Angel H. Roffo. ³IBYME.

Proteínas reguladoras del ciclo celular han sido propuestas como marcadores en distintas patologías tumorales. En este trabajo, se estudió la expresión de la ciclina D1 y del inhibidor p16, en tumores de mama humanos. Cortes histológicos de tumores (n= 70), peritumores (n=10) y patología benigna (n=23) fueron sometidos a IHQ, usando Ac anti ciclina D1 y p16. Se prepararon extractos proteicos a partir de los tejidos mencionados, para WB. En ambos casos, los datos fueron analizados en función de los parámetros clínico-patológicos de cada paciente. Mediante WB, se encontró un aumento de la expresión de ciclina D1 (2 a 10 veces) en 9 de 10 casos, al comparar el tejido tumoral con el peritumoral correspondiente. Por

ambas técnicas se determinó una alta expresión de ciclina D1 en el 50% de los tumores y sólo en el 25% de los tejidos benignos. El 48% de los tumores no expresó p16, mientras que sólo el 28% de los tejidos benignos lo perdió. El aumento de la expresión de ciclina D1 y la pérdida de p16 no se asociaron con el estadio, el tamaño tumoral, el grado nuclear, el grado histológico ni el índice mitótico. Sin embargo, los niveles de ciclina D1 se incrementaron en forma paralela al número de ganglios comprometidos (p<0.05) y su expresión dependió de la presencia de receptores esteroides (p<0.001), mientras que los de p16 estuvieron realacionados con el estadio (p<0.05). Por lo tanto, estas moléculas reguladoras del ciclo celular podrían poseer utilidad clínica para el manejo del paciente con cáncer de mama.

15. Regulación de la actividad telomerasa por HSP90.

Sara Zurita, María Eugenia Martín, Denise Muñoz y Alberto Baldi.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Buenos Aires, Argentina.

La telomerasa es una enzima que cataliza la extensión de secuencias teloméricas repetitivas TTAGGG presentes en los extremos cromosomales. El control de la actividad enzimática se ejerce a nivel transcripcional y postranscripcional. En el presente trabajo demostramos que este último mecanismo involucra la asociación de la telomerasa con Hsp90. Como agente desacoplante de tal interacción, utilizamos geldanamicina (GD), un antibiótico de la familia de las ansamicinas benzoquinoides que bloquea el dominio de unión a ATP de Hsp90 y de otras chaperonas. Células NSO (ATCC) quiescentes fueron re-estimuladas con el agregado de suero fetal bovino conjuntamente con GD. La actividad de telomerasa fue valorada a partir de extractos celulares mediante el ensayo TRAP-PCR. Se estableció la concentración de GD óptima en función al tiempo de tratamiento. Los extractos celulares controles y tratados con GD 1µg/ml durante 48 horas fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-Hsp90 y concentrados por centrifugación. Los resultados revelaron que en las células no tratadas la actividad telomerasa fue detectada en el co-inmunoprecipitado, siendo nula en el sobrenadante. Contrariamente, la GD redujo significativamente la actividad del inmunocomplejo. Estas evidencias indican que la actividad enzimática es dependiente de la interacción con Hsp90 preservando posiblemente su conformación estructural.

16. Detección de N-CAM en suero humano. Alteración de sus niveles en pacientes con patología cerebral tumoral. Laura Todaro, Lydia Puricelli, Mirta Varela, Guadalupe Pallota., José Lastiri, María López Lincuez, Elisa Bal de Kier Joffé, Eugenia Sacerdote de Lustig.

Área Investigación, Instituto de Oncología «A.H. Roffo» y Servicio de Oncología Clínica, Hospital Italiano de Buenos Aires.

La N-CAM es una glicoproteína de membrana, que promueve la adhesión entre neuronas estabilizando las uniones sinápticas. N-CAM puede hallarse en el suero, aunque se conoce poco sobre su modulación en estados patológicos. Nuestro objetivo fue cuantificar N-CAM en el suero de pacientes con distintas patologías cerebrales. Se incluyeron 29 controles sanos (C), 18 pacientes con gliomas (G), 13 con metástasis (MT) y 11 con patología benigna. Los niveles de N-CAM se estudiaron por Western blot y densitometría: a) en condiciones no reductoras, revelándose con un anticuerpo monoclonal (AcMo) reactivo contra la región polisialilada y b) en condiciones de reducción e incubación con un anticuerpo policlonal (AcP) contra la región carboxilo-terminal. Con el AcMo se revelaron bandas específicas de alto (140-180) y bajo PM (100-120 kDa). Los controles presentan niveles significativamente mayor de las bandas de bajo PM respecto de los pacientes con cualquier patología, mientras que las de alto PM (en par-

ticular la de 145 kDa) aparecen incrementadas sólo en el suero de los pacientes con patología benigna o con gliomas [pe: C: Md =0.36 (0-2.4) vs G: 0.85 (0.1-5.3), (p<0.05)]. Sorprendentemente el AcP reconoció una única banda de 80 kDa, que está aumentada en todos los pacientes con patología cerebral [pe: C: Md=1.06 (0.14-1.93) vs G: 1.28 (0.3-14.1)]. En conclusión, se describe la presencia de una banda de N-CAM de 80 kDa, significativamente aumentada en el suero de pacientes con patología cerebral, aunque no se encontraron diferencias entre portadores de tumores primarios, benignos o malignos, o con MT. Además, los sueros de todos estos pacientes son ricos en las isoformas de alto PM, reveladas con AcMo. Futuros estudios indicarán la utilidad de N-CAM soluble como marcador en patología cerebral.

17. Ensayos preclínicos de protección antitumoral con el preparado vacunal GM3/VSSP en el melanoma murino B16. Mariano Gabri, Marcelo Guthmann, Giselle Ripoll, Daniel Alonso, Leonardo Fainboim y Daniel Gomez.

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes y División de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires. mrgabri@unq.edu.ar

El monosialogangliósido GM3 es un blanco atractivo en el desarrollo de vacunas antitumorales, expresado en melanomas humanos y murinos. Se evaluó un preparado vacunal de GM3 conjugado hidrofóticamente al complejo proteico OMP de *N. Meningitidis* en proteoliposomas (GM3/VSSP), desarrollado y provisto por el Centro de Inmunología Molecular (Cuba) y Laboratorio ELEA (Argentina). Un total de 70 ratones macho C57BL/6 recibieron 4 dosis de 120, 240 ó 360 µg de GM3/VSSP emulsionado en Montanide ISA 51 cada 2 semanas por vía intramuscular o sólo el adyuvante. Los animales fueron desafiados con células B16-F0 en el espacio subcutáneo del flanco a distintos tiempos después de la inmunización. Para los animales desafiados con 2.500 células la protección antitumoral fue máxima entre 3 y 5 semanas después de la última dosis, disminuyendo a partir de la semana 15 (Incidencia tumoral; Control: 80%, GM3/VSSP 3-5 semanas: 0%, >15 semanas: 68%; p<0.001, Chi²). En animales desafiados con 10.000 células, la máxima protección mostró dependencia de la dosis (Incidencia tumoral; Control: 100%, GM3/VSSP 120 µg: 30%, 240 µg: 20%, 360 µg: 11%; p<0.01, Chi² para tendencia). Los datos sugieren que en un modelo preclínico de melanoma, la protección inducida por GM3/VSSP es dosis-dependiente y se sostiene por varios meses sin necesidad de reinmunizaciones.

18. La vacunación con células B16 irradiadas y rmGM-CSF estimula una respuesta antitumoral específica e inhibe el crecimiento tumoral en ratones C57Bl. Laura Bover, Mariano Ochoa, Cynthia López-Habery y José Mordoh.

Instituto Leloir, "Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina.

Nuestro propósito fue analizar en el modelo de melanoma murino B16-F1 los adyuvantes BCG y saponina de Quillaja Bark y el efecto de la inyección local de rmGM-CSF en la protección conferida por la vacunación con células B16 irradiadas. Los ratones control fueron tratados con PBS con o sin el agregado de los adyuvantes correspondientes. La vacunación consistió en la inyección sc de 4 dosis semanales de células B16-F1 irradiadas (50 Gy) y un refuerzo 2 semanas más tarde (n=7 ratones por grupo) con los adyuvantes BCG (1x10⁵ microorg.) o saponina (10 µg/vac). Algunos grupos vacunados recibieron rmGM-CSF (72 ng/día/ratón, 4 días). El crecimiento tumoral y la respuesta inmune fueron evaluados luego del desafío con 1,3 x 10⁴ células B16 vivas. El agregado de rmGM-CSF a las células irradiadas confirió mayor protección (BCG = 33%; saponina = 43%) (Wilcoxon, p<0.05 y p<0.01 respectivamente). Los tumores en los ratones vacunados con células y adyuvantes o los controles alcanzaron mayor tamaño y causa-

ron la muerte de los animales a los 20-40 días del desafío. Las vacunas B16 + adyuvantes + rmGM-CSF desarrollaron en los animales protegidos anticuerpos séricos específicos detectables por ELISA y Western-blot (bandas >1.4 x 10⁵ Da). Nuestros resultados indican que el uso de saponina o BCG como adyuvante y el agregado de rmGM-CSF aumenta la eficacia de la vacunación en este modelo murino.

19. Daños subcelulares inducidos por la terapia fotodinámica a partir de ALA libre y liposomal.

Christian Perotti*, Adriana Casas*, María Sacolitti**, Haydée Fukuda* & Alcira Battle*.

**Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, CONICET y FCEyN, UBA. ** Servicio de Patología, Hospital Durand, Buenos Aires. e-mail:hufukuda@qb.fcen.uba.ar*

La Terapia Fotodinámica del cáncer (TFD) se basa en la acumulación selectiva de un fotosensibilizante en las células tumorales, que al ser excitado por la luz, desencadena reacciones mediadas por radicales libres que destruyen el tejido maligno. Entre los fotosensibilizantes más usados, se encuentran las porfirinas, y es de especial interés el empleo del precursor de las mismas, el ácido 5-aminolevulínico (ALA). En el presente trabajo se emplearon explantes del adenocarcinoma murino M2 (Instituto Roffo) para evaluar el tipo de daño subcelular inducido por la TFD luego de tratamiento con ALA libre y liposomal. Los explantes tratados se observaron por microscopía óptica y electrónica y se determinaron las actividades de enzimas marcadoras de daños de organelas. Las estructuras más afectadas por la TFD fueron: membrana plasmática, retículo endoplasmático y mitocondrias. La administración de ALA liposomal indujo una reducción del 30% de la actividad β-N-acetil-D-glucosaminidasa (marcadora de daño lisosomal), independientemente de la iluminación. La citocromo c reductasa (marcadora de daño de retículo endoplasmático) se vio disminuida un 40% por la aplicación de luz independientemente de la exposición previa al ALA. Se discuten los mecanismos de entrada del ALA libre y liposomal a la célula, teniendo en cuenta la formación de porfirinas luego de la exposición al ALA 0,6 mM a 0°, 18° y 37 °C, y se establece su relación con el tipo de daño subcelular.

20. Caracterización de lesiones preneoplásicas y neoplásicas experimentales en la mucosa bucal por análisis de ploidía. Ana Raimondi, Rómulo Cabrini, María Itoiz.

Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. LANAIS - Microespectrofotometría, CONICET - Comisión Nacional de Energía Atómica. (postmaster@cap.odon.uba.ar)

La cancerización con DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno) de la bolsa de la mejilla del hamster es el modelo más utilizado de cáncer bucal. Las lesiones premalignas y tumorales que presenta el modelo son iguales a las de la boca humana, en ambos casos se describen subjetivamente con criterios morfológicos. Con el fin de cuantificar estas lesiones y obtener valores objetivos se realizó un estudio de ploidía por análisis de imágenes en cortes teñidos por Feulgen. Se utilizaron 38 hamsters topicados con DMBA al 0,05% 3 veces por semana durante 4 meses. Se seleccionaron zonas de: carcinoma (Ca), carcinoma in situ (CIS), displasia (D), hiperplasia (H), epitelio tratado sin cambios histológicos (NUMF: non unusual microscopic findings) y epitelios controles no tratados (C). Los valores de ploidía fueron significativamente diferentes entre C (2,23±0,13) y NUMF (2,78±0,10), H (3,11±0,13), D (2,92± 0,17), Ca (3,35±0,14), CIS (3,26±0,32), Newman-Keuls p<0,05. Los NUMF, H y D presentaron valores de aneuploidía mayores al C (7±1,4; 8,1±1,7; 6,8±2,1 vs 1,7±0,9 p<0,05) y los Ca y CIS los valores más altos (12,9±1,9; 13±3,9). Este estudio permitió caracterizar numéricamente las diferentes lesiones

preneoplásicas y neoplásicas del modelo, y se evidenciaron alteraciones en el contenido de ADN en epitelios de apariencia histológica normal (NUMF).

21. Aplicaciones de BNCT al tratamiento del Cáncer Indiferenciado de Tiroides (CIT).¹Alejandra Dagrosa, ¹Mabel Viaggi, ²Silvia Farias, ²Ricardo Garavaglia, ¹Rómulo Cabrini, ¹Guillermo Juvenal, ^{1,3}Mario Pisarev.

¹Dto. de Radiobiología, ²Dto. de Química, Comisión Nacional de Energía Atómica. ³Fac. de Medicina, UBA. Dagrosa@cnea.gov.ar.

La Terapia por Capura Neutrónica en Boro (BNCT) para el tratamiento de tumores se basa en la reacción que ocurre cuando el ¹⁰B es irradiado con neutrones térmicos, que al producir partículas alfa (⁴He) genera un efecto letal. El objetivo de este trabajo fue explorar la aplicación del BNCT en el CIT, estudiándose la captación de la borofenilalanina (BPA) *in vitro* e *in vivo*. Se utilizaron la línea celular humana ARO de CIT, cultivos primarios de adenoma tiroideo humano y tiroides bovinas. Las células fueron incubadas con una solución de BPA en concentraciones de 10 a 75 µg de ¹⁰B/ml. Se implantaron células ARO en ratones NIH nude, a las 4 semanas se les inyectó i.p. 350 mg/kg de BPA. Se tomaron muestras de distintos tejidos, para histología y medición de ¹⁰B por ICP/AES. La captación de BPA en las células aumenta en relación directa con el incremento de dosis del compuesto. A 75 µg/ml de ¹⁰B la captación es de 2.83±0.23 para las ARO, 0.69±0.01 para el cultivo primario y 0.55±0.02 para el bocio nodular, (ng ¹⁰B/µg prot ± SEM, P<0.001) Las células tumorales concentran 4 y 5 veces más boro que las bovinas y el bocio nodular respectivamente. La captación máxima por el tumor fue a los 60 min, con una relación tumor/sangre de 5.5 y tumor/tiroides normal de 4, (tumor:16.8±3.57; sangre: 3.04±0.75; tiroides: 4.39±0.68), (µg ¹⁰B/g ± SEM). Estos resultados abren la posibilidad de la aplicación del BNCT al CIT.

22. Respuesta inmune específica para el gangliósido GM3 en ratones inmunizados con la vacuna de cáncer GM3/VSSP-Montanide. Marcelo Guthmann, Mariano Gabri, Ariel Camero, Victoria Del Pino, Guillermo Gianbartolomei, Roberto Bitton, Daniel Alonso, Daniel Gomez y Leonardo Fainboim.

Div. Inmunogenética, Hospital de Clínicas, UBA; Lab. de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes y Laboratorio Elea. (ruculeufu@arnet.com.ar)

El monosialogangliósido GM3 es un componente normal de la membrana celular. Su sobreexpresión en tumores ectodérmicos lo destaca como potencial blanco inmunoterapéutico. GM3 ha sido conjugado con proteínas derivadas de la pared de *N. meningitidis* [GM3/VSSP, desarrollado por el Centro de Inmunología Molecular (Cuba) y Laboratorio Elea (Argentina)]. La administración de GM3/VSSP adyuvantizado en Montanide ISA 51 a ratones C57BL/6 ha demostrado ser protectora en el modelo de melanoma B16. Hemos estudiado ahora la evolución de la respuesta inmunológica contra los componentes de la vacuna a distintos tiempos luego de un esquema fijo de vacunación de 4 dosis quincenales de 120 µg de conjugado. La formulación vacunal indujo una respuesta de anticuerpos IgG específica para GM3 (rango de título 80-160). Esplenocitos derivados de ratones tratados respondieron al preparado vacunal en un ensayo de linfoproliferación (rango de índice de estimulación: 2-5,5). Se detectó la secreción de IFN-γ en respuesta al preparado vacunal en cultivos de esplenocitos de ratones tratados (100-200 pg/10⁶ células x 48 h). La producción de anticuerpos IgG contra GM3 en el marco de una fuerte respuesta TH1 (secreción de IFN-γ podría estar involucrada en la ya demostrada actividad protectora antitumoral del preparado vacunal contra el melanoma B16.

23. Catepsina B en pacientes con carcinoma transicional de vejiga. Eduardo O. Sandes, María D. Riveros, Silvia Kohan, Francisco Celeste, Eugenia S. de Lustig, Alberto R. Casabé, Ana M. Eiján.

Departamentos de Inmunobiología, Urología y Anatomía Patológica. Inst. A.H. Roffo. Av. San Martín 5481, 1417 Bs As. Argentina. e-mail: amerueda@ciudad.com.ar

La catepsina B (CB) es una cisteína proteasa lisosomal involucrada en la invasión y metástasis tumoral y en diferentes procesos inflamatorios crónicos relacionado con la presencia de macrófagos. En trabajos previos, demostramos que pacientes con cáncer transicional de vejiga (CTV) presentan niveles aumentados de CB tanto séricos como urinarios. En este trabajo intentamos evaluar que población celular (cels. tumorales o macrófagos) interviene significativamente en el incremento de CB observado en los trabajos mencionados. Para ello determinamos por inmunoblot, los niveles de CB en homogenatos de nueve (9) tumores de vejiga (CTV), siete (7) de ellos superficiales y dos (2) invasores; por otro lado se determinaron los niveles de CB en medios condicionados de células mononucleares de pacientes con CTV a las 48 hs. de cultivo (n=4), para lo cual se utilizó un anticuerpo anti-CB humana policlonal y un segundo anticuerpo con fosfatasa alcalina. Los resultados indican que solo los tumores invasores (2/9) expresaron CB (192 µg CB/ mg prot. +/- 33 y 640 µg CB/mg prot. +/- 38). La determinación de CB en los medios condicionados de células mononucleares de pacientes presentó un incremento del 50 % con relación a medios condicionados de células mononucleares de individuos sanos. Si bien es necesario evaluar un mayor número de casos, estos resultados indican que las células mononucleares estarían involucradas en la producción de CB y que los tumores invasores expresan CB.

INMUNOLOGIA I

24. Importancia de la metodología utilizada para la detección de apoptosis en células Vero infectadas con Rubeola. Pilar Adamo, Cecilia Cuffini y Marta Zapata.

Instituto de Virología, Facultad de Ciencias Médicas, UNC. e-mail: mzapata@cnefcm.uncor.edu

El virus Rubeola (vR) activa el programa de muerte apoptótica en células Vero. Con el fin de analizar la conveniencia de distintos métodos de detección de apoptosis en células en cultivo infectadas con vR se compararon las técnicas de tinción de hematoxilina y eosina (HE), TUNEL, microscopía electrónica (MET) y electroforesis del ADN, utilizando células Vero y una cepa local de vR. Empleando una multiplicidad de infección (MOI) = 10 la técnica de HE ha permitido distinguir un 26,18% de células apoptóticas (A) a los 3 días postinfección (dpi), 45,41% a los 4 dpi y 47,37 a los 5, mientras que en el control este valor fue 1,5. Se observó que este parámetro varía en relación directa con la MOI aplicada. La técnica del TUNEL sobre las células en monocapa arrojó menores porcentajes de A, con la misma MOI. Se vio que la eficacia de la aplicación de este método, como la de la electroforesis en gel de agarosa del ADN de las células y la de MET, aumenta al considerar no sólo las células en la monocapa sino también las desprendidas, flotando en el sobrenadante. Las ventajas y desventajas de cada método son discutidas, para establecer un marco objetivo que posibilite la elección del más adecuado para el sistema en estudio.

25. Efecto «priming» del Factor de Necrosis Tumoral-α (TNF-α) sobre la apoptosis de los neutrófilos humanos. Gabriela Salamone, Mirta Giordano, Analía Trevani, Romina Gamberale, Mónica Vermeulen, Jorge Schettini y Jorge Geffner.

Departamento de Inmunología. IIHEMA. Academia Nacional de Medicina. Laboratorio de Inmunogenética. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. e-mail: geffner@mail.retina.ar

Analizamos aquí, la capacidad del TNF- α de modular la apoptosis de neutrófilos humanos. La apoptosis fue evaluada por microscopía de fluorescencia, a las 3 horas de cultivo, empleando naranja de acridina y bromuro de etidio. Los resultados fueron confirmados por el test de unión de anexina V (FITC). El cultivo de los neutrófilos con TNF- α indujo un leve pero significativo ($p < 0.01$) incremento en los porcentuales de apoptosis: $5 \pm 3\%$ vs $13 \pm 3\%$ (controles vs 10 ng/ml de TNF- α , $n=13$). Examinamos luego los porcentuales de apoptosis en células pretratadas o no con TNF- α (10 ng/ml) por 1-2 min y cultivadas luego por 3 horas en presencia o ausencia de diversos agentes: ilgG (IgG inmovilizada), Z (zimósán, 200 μ g/ml), E. coli (Escherichia coli, 10^9 UFC/ml), PMA (ácido forbol mirístico, 1nM) y LPS (lipopolisacárido bacteriano, 1 μ g/ml). Los porcentuales de apoptosis encontrados para los diferentes grupos fueron: control, 5 ± 3 ; ilgG, 7 ± 3 ; Z, 8 ± 2 ; E.coli, 7 ± 1 ; PMA, 5 ± 2 ; LPS, 4 ± 1 ; TNF- α , 14 ± 3 ; TNF- α + ilgG, 64 ± 7 ; TNF- α + Z, 79 ± 7 ; TNF- α + E.coli, 61 ± 6 ; TNF- α + PMA, 59 ± 5 y TNF- α + LPS, 6 ± 3 ($n=7-15$). Los resultados obtenidos indican que el TNF- α ejerce un poderoso efecto "priming" sobre el proceso apoptótico del granulocito neutrófilo, efecto que no fue reproducido por otras citoquinas tales como IL-1- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, interferón- γ y el GM-CSF.

26. Inhibición de apoptosis a nivel intestinal como mecanismo de bacterias lácticas para el control de *Salmonella typhimurium*. Gobbato Nadia¹, Medici Marta², Rachid Mirta¹, Valdez Juan¹ y Perdigón Gabriela^{1,2}

¹Cátedra de Inmunología. Facultad de Bioquímica. UNT. Ayacucho 491, 2º piso, 4000. Tucumán. ²CERELA. e-mail: perdigon@cerela.org.ar

La diseminación de *Sal. typhimurium* (*Sal.typ*) es por apoptosis de las células infectadas. El efecto preventivo anti-infecciones de las bacterias lácticas (BL) está bien documentado. El/los mecanismos no es/son conocido/s, ha sido asociado a un incremento de la IgA-S. En trabajos previos, demostramos que, *L. bulgaricus* (L.b) y *S. thermophilus* (S.t) protegen contra *Sal.typ*. **Objetivos:** Determinar si L.b. y S.t. poseen efecto en la inhibición de apoptosis. **Mat y Mét:** Ratones BALB/c fueron alimentados con L.b (7 días) y S.t (5 y 7 días), dosis protectivas. Al final de cada período de alimentación y en el grupo control (GC) se desafió con 20DL50 de *Sal.typ* y se sacrificaron al 5º y 7º día post-desafío. Se realizó ensayos de colonización en hígado y bazo. En cortes histológicos de I. Delgado(ID) se midió apoptosis por el test de Tunel. **Resultados:** los ensayos de colonización fueron negativos en los animales tratados con BL, no así en los GC (10^6 bact/órgano. Por Tunel, en los GC se vió una marcada apoptosis para los períodos post-desafío (valor control promedio=62 cél ap/20V). Los animales tratados con BL e infectados: Lb (5y7d post-desafío=33cél ap/20V); St(5d=32cél ap/20V, 7d=36cél ap/20V). **Conclusiones.** Lb y St. protegerían contra la infección con *Sal.typ* por inhibición de apoptosis evitando así la diseminación del patógeno a tejidos profundos.

27. Apoptosis de neutrófilos humanos inducida por IgA. Jorge Schettinni, Gabriela Salamone, Analía Trevani, Romina Gamberale, Mirta Giordano y Jorge Geffner.

Departamento de Inmunología. IIHEMA. Academia Nacional de Medicina. Laboratorio de Inmunogenética. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. e-mail: geffner@mail.retina.ar

Hemos demostrado que los complejos inmunes (CI) formados por anticuerpos IgG (CI-IgG) modulan la apoptosis de los

neutrófilos, a través del Fc γ RII. Analizamos aquí, si los CI formados por anticuerpos IgA modulaban también la apoptosis de los neutrófilos. Como modelo de CI empleamos IgA inmovilizada, secretoria (ilgAs) y plasmática (ilgAp). La apoptosis fue evaluada por microscopía de fluorescencia, a las 8 horas de cultivo, empleando naranja de acridina y bromuro de etidio. Tanto la ilgAs como la ilgAp, indujeron un marcado incremento en la apoptosis: $11 \pm 2\%$, $53 \pm 4\%$ y $42 \pm 3\%$ (controles, ilgAs e ilgAp, respectivamente, $n=8$, $p < 0.01$ controles vs ilgA). En acuerdo con las observaciones realizadas para CI-IgG, encontramos que: 1) la catalasa (200 U/ml) suprimió la promoción de apoptosis inducida por ilgAs e ilgAp: % supresión 87 ± 9 y 83 ± 7 , respectivamente ($n=5$) y 2) un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-FasL no indujo efecto supresor alguno. Por otra parte, a diferencia de lo observado para CI-IgG, encontramos que un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-CD18 suprimió la promoción de apoptosis por ilgAs e ilgAp: % supresión; 91 ± 9 y 88 ± 7 , respectivamente ($n=6$). Nuestros resultados indican que, en forma similar a los anticuerpos IgG, los anticuerpos IgA son capaces de modular la apoptosis de los neutrófilos, no obstante, los mecanismos involucrados no son coincidentes.

28. Diferencias en la actividad de NOS de glándulas salivales en un modelo experimental de sialadenitis autoinmune. Florencia Rosignoli[#], Nora Goren[†], Claudia Pérez Leirós[#].

[#]Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires-CONICET. [†]Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos-CONICET.

Los ratones diabéticos no obesos (NOD) presentan una respuesta inmune contra las glándulas salivales asociada a pérdida de función secretoria y por eso constituyen un buen modelo experimental para el estudio del síndrome de Sjögren. En este trabajo investigamos la producción de óxido nítrico por glándulas submaxilares de ratones NOD debido al papel de este mediador tanto en la transducción de señales acopladas a receptores de neurotransmisores en condiciones normales, como en procesos inflamatorios. Se usaron ratones BALB/c como controles. Se midió la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) con L-[U¹⁴C]-arginina como sustrato y la expresión de isoformas constitutiva e inducible por inmunoblotting. Se observó una disminución de la actividad basal de NOS en las glándulas de ratones NOD con respecto a los controles (pmol/mg tejido; $x \pm ES$, NOD: 127 ± 25 , BALB/c: 597 ± 54 $n=6$; $p < 0.01$). Además el VIP 10nM no modificó la actividad de NOS en los NOD con respecto al basal (143 ± 19 $n=3$), pero sí en los controles (882 ± 96 $n=4$; $p < 0.05$). Los ensayos de inmunoblotting indicaron una menor expresión de la NOS neural, sin cambios en la NOS inducible. Concluimos que las glándulas submaxilares de ratones NOD presentan una disminución en la actividad y expresión de NOS neural.

29. IA-2ic recombinante modificado por ingeniería genética y su aplicación diagnóstica en Diabetes Mellitus. ¹Mauricio P Sica, ¹María E Primo, ¹Anabel Villalba, ²Mario R Ermácora, ¹Edgardo Poskus.

¹Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, IDEHU. ²U. de Quilmes.

La detección de autoanticuerpos hacia IA-2ic (IA-2AA) es útil en la predicción de la Diabetes Mellitus (DM) Tipo 1 y DM en adultos. IA-2ic, el dominio intracelular antigénico de la proteína IA-2, es homóloga a otras tirosina fosfatasa, aunque enzimáticamente inactiva. **Objetivos:** Producir en bacterias antígeno fácilmente purificable, enzimáticamente activo para evaluar su integridad. **Materiales y métodos:** Modificación del plásmido para expresión de IA-2ic en bacterias (pTICAa): mutaciones A877D y D911G; fusión al extremo C-terminal del péptido LVPRGS(H)6 (*His-tag*). Los productos IA-2icH6, IA-

2ic(D911)H6 e IA-2ic(A877D/D911)H6 fueron purificados por IDA-*Sepharose* y analizados por SDS-PAGE, *Western Blotting* y RIA. La actividad enzimática se determinó por hidrólisis de *para-Nitrofenilfosfato*. **Resultados:** se resumen a continuación:

Modific.	H6	D911GH6	A877D/D911GH6
Concentr.	~ 1mg/mL	~ 1mg/mL	~ 1mg/mL
Pureza	> 98 %	> 98 %	> 98 %
Act.enz.	- (DO=0.110)	- (DO=0.110)	+ (DO=0.320)
Act. (RIA)	+	+	+

Conclusiones: Hemos obtenido el antígeno recombinante con suficiente rendimiento, con integridad estructural y funcional evaluable enzimáticamente e inmunquímicamente activo, como para encarar su utilización en ELISAs

30. La artritis por adyuvante (AA) en ratas crónicamente infectadas con *Trypanosoma cruzi*. I. Respuesta humoral y blastogénesis *in vitro* frente a mitógeno y *M.tuberculosis* sonicado (ST). Griselda Didoli, María L.Bay, Flavia Rondelli, Sara Feldman, Oscar Bottasso.

Inst. Inmunología, Fac. Cs. Médicas, UNR.
e-mail: Bottasso@arnet.com.ar

Trabajos previos indican que la baja respuesta artrítica de ratas «λ» infectadas crónicamente con *T.cruzi* (Tc), se revierte dando ciclofosfamida (Cy) 48 hs antes de la inducción de la AA (Adyuvante Completo de Freund, 0.1 ml en la almohadilla plantar trasera derecha -D-). Para elucidar los mecanismos que podrían mediar tal efecto, se evalúan a) los anticuerpos séricos anti-hsp 65 kD (*M.tuberculosis*) y b) la blastogénesis de células de ganglios (G) poplíteos de ratas con 90 días de infección con Tc y controles (Co) similares, **previo** a la inducción (48 hs después de recibir Cy, 25mg/kg o fisiológica) y en el pico de la AA (15 días después), ante la estimulación con ST o Concanavalina A -ConA- (objetivo b). No hubieron diferencias en los niveles de anticuerpos. Los índices de estimulación (cpm estimulado/cpm basal, día 6) fueron (media ± ds, n=4 ó 5/grupo): **Previo ST** (respuestas no relevantes), **ConA Control** (Co) 58.4±9.6, Co+Cy 140±75, Tc 49.4 ± 10.2, Tc+Cy 104.4±23 (p<0.01); **Artríticos GD**, **ST** Co 3.43±1.3, Co+Cy 3±0.39, Tc 1.9±0.22, Tc+Cy 2.84±1 **ConA** Co 53.9±13, Co+Cy 50±7.5, Tc 28.7±0.1, Tc+Cy 52.1±9.4 (p<0.025). La Cy incrementa la respuesta proliferativa a la ConA al momento de inducirse la AA y hace que el grupo Tc recobre su capacidad de responder al mitógeno en el pico de la AA en coincidencia con la ya convalidada recuperación para desarrollar la artritis.

31. La artritis por adyuvante (AA) en ratas crónicamente infectadas con *Trypanosoma cruzi*. II. Niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivos estimulados con mitógeno y sonicado de *M.tuberculosis* (ST). Griselda Didoli, María L.Bay, Adriana Del Rey, Hugo Besedovsky, Oscar Bottasso.

Inst. Inmunología, Fac. Cs. Médicas UNR.
e-mail: Bottasso@arnet.com.ar

El tratamiento con ciclofosfamida (Cy) 48 hs previas a la inducción de la artritis por adyuvante (AA) demostró revertir la baja respuesta artrítica que exhiben las ratas «λ» con infección crónica por *T.cruzi* (Tc). Para analizar los efectos de la Cy sobre mediadores solubles, se analizan los niveles de IFN-γ, IL-4 e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo (día 5) de células del ganglio poplíteo (drenante) estimuladas con Concanavalina A (ConA) o ST; obtenidas de ratas controles (Co) e infectadas (Tc, 90 días antes), tratadas con Cy o fisiológica 48 hs antes de inducir la AA. Las mediciones por ELISA (media±ds, pg/ml, n=4-5/grupo) mostraron **Previo a la AA (día 0) ConA IL-4** (valores muy bajos y sin diferencias); **IL-10** Co 465±10, Co+Cy 401±29, Tc 766±68, Tc+Cy 483±57 (p<0.01); **IFN-γ** Co 2159±189, Co+Cy 2197±215, Tc 1830±193, Tc+Cy 1692±158

(p<0.05). Los cultivos estimulados con ST también mostraron valores bajos y sin diferencias. **Pico de la AA**, **IL-10**, **ST** Co 168±78.5, Co+Cy 181±58, Tc 178±5.4, Tc+Cy 140±64, **ConA** Co 1181±73.8, Co+Cy 1174±144, Tc 1337±166, Tc+Cy 1181±147. Los niveles de IL-4 e IFN-γ (ST o ConA) tampoco difirieron. La estimulación con ConA al día 0 en el grupo Tc revela una producción descendida y aumentada de IFN-γ e IL-10, respectivamente; con una normalización en los niveles de ésta última al recibir Cy 48 hs antes.

32. Expresión de CD44 en células linfomononucleares en un modelo de orquitis autoinmune. Vanesa Guazzone, Berta Denduchis, Livia Lustig.

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.
e-mail: ciruba@fmed.uba.ar

Se ha descripto que el CD44, puede iniciar al igual que las selectinas, el primer contacto de los linfocitos con el endotelio. También se observó que en ciertas inflamaciones crónicas, los linfocitos exhiben un aumento en la expresión de CD44. Interesados en determinar las variaciones en la expresión de CD44 en los linfocitos que migran y extravasan en el intersticio testicular en un modelo de orquitis autoinmune (OAE), se indujo una OAE en la rata por inmunización activa con antígenos espermáticos y adyuvantes. Se sacrificaron los animales con OAE y controles (C) a los 35, 50, 80, 160 y 300 días. Se estudió la histopatología testicular, la expresión de CD44 en testículo por inmunohistoquímica y en los linfocitos de sangre periférica y ganglios linfáticos por citometría de flujo (CF). A partir de los 50 días, período en el cual se inicia la lesión de los túbulos seminíferos en la OAE se detectó un aumento de células linfomononucleares CD44+: OAE vs C; 50 días: 446±18.2 vs 110±1.1 (p=0.02); 300 días: 270±5.7 vs 120±10 (p=0.05). Por CF no se observaron diferencias significativas en el número de linfocitos CD44+ en sangre periférica y ganglios de ratas con OAE y C. La mayor expresión de CD44 en el testículo sugiere que esta molécula, al igual que ICAM-1, LFA-1, VCAM y L-selectina previamente estudiadas, está involucrada en la inducción de la lesión autoinmune.

33. Producción de anticuerpos monoclonales anti-Transglutaminasa recombinante humana. F.G. Chirido, A. Osman, T. Mothes, M. Rumbo, M.C. Añón y C.A. Fossati.

Cát. Inmunología y CIDCA. Fac. Cs. Exactas. UNLP. La Plata. Leipzig University. Alemania. fchirido@biol.unlp.edu.ar

El potencial rol de la transglutaminasa (tTG) en la patogenia de la Enfermedad Celíaca (EC) y su aplicación en ensayos de ELISA para estudios serológicos como reemplazo a la técnica de anti-endomisio (EMA) por inmunofluorescencia (IFI) han generado un enorme interés por el estudio de esta enzima. Por biología molecular se ha obtenido la proteína humana recombinante (hu-tTG). Nuestro objetivo es la producción y caracterización de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-hu-tTG. La obtención de hu-tTG se realizó partiendo de RNA de fibroblastos intestinales. El gen de hu-tTG fue amplificado a partir del cDNA y clonado. Utilizando un vector de expresión, la hu-tTG fue producida en *E. coli*. Se obtuvo un suero por inmunización de ratones BALB/c con la proteína recombinante y luego se procedió a la producción de mAbs anti-hu-tTG. El suero de ratón obtenido reconoce específicamente a la hu-tTG originando un pattern de IFI similar al observado en una prueba positiva de EMA. Se obtuvieron tres mAbs capaces de reconocer a hu-tTG. Dos de ellos reconocen a la tTG comercial (de cobayo) en ELISA indirecto. El tercer mAb reconoce a la tTG en el ensayo de IFI con el pattern característico. El empleo de los mAbs obtenidos facilitará la purificación de la proteína recombinante. Además, dado que tienen distinto reconocimiento, permitirán evaluar la presencia de epitopes inmunodominantes en la hu-tTG frente a sueros de celíacos.

34. Un método de ELISA original para la detección de GADA, útil en la prospección de Diabetes Mellitus autoinmune. Ana L Villanueva, Silvina N Valdez, Edgardo Poskus.

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA e IDEHU (CONICET-UBA). Junín 956 (1113).

Los autoanticuerpos anti Glutamato Decarboxilasa (GADA) constituyen un valioso marcador de Diabetes Mellitus (DM) mediada por autoinmunidad. También se ha descrito su presencia en Síndrome de *Stiff-man* y en Poliendocrinopatías autoinmunes. El análisis de referencia para GADA se basa en la radioinmunoprecipitación (IP) de GAD65 humana producida en sistemas eucariontes. Debido a su alta complejidad, su uso se limita a pocos laboratorios. Se desarrolló una variante de ELISA (pa-ELISA) empleando la proteína de fusión Trx-GAD expresada en bacterias. Esta metodología fue evaluada en paralelo con el método de referencia:

	DM (n=66)	Normales (n=50)
IP (positivos)	49 (74%)	0 (0%)
pa-ELISA (positivos)	33 (50%)	2 (4%)

El coeficiente r de correlación entre ambas metodologías fue de 0.65, $p < 0.0001$. Para pa-ELISA los CV intraensayo (n=50) fueron 10.8% a $DO < 0.5$, 10.7% a $DO = 0.5-1.5$ y 7.9% a $DO > 1.5$. El CV interensayo (n = 3) fue de 6.9%. Si bien la *performance* de esta variante enzimática, basada en el antígeno Trx-GAD es inferior a la del método de referencia, es aceptable y además carece de los inconvenientes del método radiométrico, exhibiendo claras ventajas respecto de la simplicidad operativa y de los costos.

35. Bloqueo del sistema retículo endotelial (SRE) por un bisfosfonato (clodronato) encapsulado en liposomas (lip-clod) como nueva estrategia de tratamiento de un modelo murino de purpura trombocitopénica inmune (PTI) inducida por anticuerpos. Fernanda Alves Rosa, Carmen Stanganelli, Juana Cabrera, Sonia Gómez, Dora Cymbeknop, Nico van Rooijen, Marina Palermo, Martín Isturiz.

División Inmunología. Academia Nacional de Medicina. Facultad de Medicina. Vrije Universiteit. Amsterdam. ferar@ciudad.com.ar

La PTI es una patología asociada a la presencia de IgG asociada a plaquetas y su posterior destrucción por parte del sistema retículo endotelial (SRE). El 30% de las PTI son refractarias a todo tipo de tratamiento siendo necesaria la incorporación de nuevas estrategias terapéuticas. Previamente estudiamos el efecto del lip-clod (200 μ l preparación original: 21.5 mg/ml. fosfatidilcolina; 2mg/ml. colesterol; clodronato 0.7M), que elimina macrófagos hepáticos y esplénicos del SRE en un modelo de PTI. En este trabajo evaluamos el efecto de distintas dosis de lip-clod sobre la PTI experimental y observamos que el incremento del recuento de plaquetas depende directamente de la eliminación de las células macrofágicas (corroborado por cámara gamma utilizando ^{99m}Tc -Fitato). Así, ratones trombocitopénicos tratados con 200 μ l lip-clod diluido 1:4; 1:8; 1:16 y 1:32 aumentaron significativamente el recuento plaquetario (plaq. $\times 10^3 \pm SEM$: 110.1 \pm 4.5; 112.5 \pm 28.1; 125.8 \pm 15.7; 98.8 \pm 23.1, respectivamente, control: 550 \pm 18.7 vs. Ac: 47.0 \pm 6.3, * $p < 0.001$, n=18) mientras que 1:64 y 1:256 no ejercieron efecto alguno. La respuesta inmune humoral frente a glóbulos rojos ovinos fue normal en todos los grupos tratados. El tiempo de sangría de ratones tratados con las dosis efectivas de lip-clod permanecieron dentro del rango normal (0.7-3.75min. vs. Ac: >10min, * $p > 0.01$) indicando que la hemostasia está bien controlada en estos animales. Estos datos demuestran que este método es capaz de revertir la PTI experimental

sin comprometer funciones esenciales como la respuesta inmune y la activación plaquetaria.

36. Detección de Ac. Antiqueratina y Factor Reumatoideo en pacientes con Artritis Reumatoidea Juvenil. Cecilia Ilvento*, Alejandra Ginaca*, Patricia Carabajal*, Graciela Espada, Paula Weissbrod, Lina Leggire, María Rivas*.

Inmunología y Reumatología. Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. Gallo 1330. Capital Federal. Fax 011-4962-8933*

Los pacientes con AR presentan una amplia variedad de autoanticuerpos circulantes, como factor reumatoideo (FR), ac. antinucleares, ac. antiqueratina (AKA), etc. Los AKA, dirigidos contra la proteína filagrina del estrato córneo, se describen en AR del adulto con alta especificidad y en un grupo de pacientes poliarticulares FR negativos. La detección de FR muestra baja sensibilidad en ARJ, pudiendo detectarse en diversas patologías. Objetivo: determinar: a) la presencia de AKA en un grupo de pacientes pediátricos con ARJ y su especificidad. b) analizar y comparar la prevalencia de FR por 2 técnicas. Material y Métodos: se estudiaron 79 sueros de niños con diagnóstico de ARJ (criterios ACR), promedio de edad: 12 años- (48 mujeres-31 varones). Como grupo control se estudiaron 25 niños con enfermedades inflamatorias no AR (9 LES, 6 dermatomiositis, 10 vasculitis) y 41 sueros de niños sanos. Los AKA se determinaron por IFI en esófago de rata; el FR por Nefelometría (cut off: 30 U/ml) y Látex (cut off: 8 UI/ml). Resultados: Los AKA fueron negativos en 100% de ARJ y controles. En ARJ se encontró : 21/63 pacientes (33%) FR positivo por nefelometría y 8/63 (13%) positivos por látex. En el grupo control se encontró 2/66 pacientes FR positivo por nefelometría. **Conclusión:** los AKA no son marcadores útiles para el diagnóstico de ARJ. La nefelometría mostró mayor sensibilidad para la detección de FR en nuestra población de ARJ.

37. Anticuerpos predictivos de diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) en pacientes celíacos. Sandra Verbeke¹, Patricia Vallejos², Blas Micalizzi¹

¹Centro de Inmunología Clínica, Cátedra de Inmunología. Universidad Nac. de San Luis. ² Centro Médico Privado e-mail: dapalma@infovia.com.ar

Los pacientes celíacos constituyen un grupo de alto riesgo para la asociación de otras enfermedades autoinmunes. Se ha informado que, a mayor tiempo de exposición al gluten, mayor riesgo de asociación de otras patologías con base autoinmune. El objetivo de este fue correlacionar la presencia de anticuerpos predictivos de IDDM con el cumplimiento del régimen sin gluten en pacientes celíacos: a) al momento de diagnóstico y b) en dieta libre de gluten. Se estudiaron 73 pacientes celíacos divididos en 3 grupos: MD [diagnóstico(n=53)], CT [transgresores(n=11)] y CNT [no transgresores (n=10)]. Se determinó en suero la presencia de anticuerpos anti-isolote pancreático (ICA) por IFI, y anti-insulina (IAA) por RIA. Los resultados obtenidos fueron: para ICA, MD: 13,20%; CT: 36,36% y CNT: 20,00%, y para IAA, 32,26%, 54,54% y 28,57% respectivamente. Se concluye que: 1.- Los pacientes celíacos presentan un alto porcentaje de anticuerpos predictivos de IDDM, con el riesgo de asociar una futura diabetes. 2.- Los celíacos diagnosticados tardíamente o los transgresores, presentan un porcentaje mayor de marcadores de asociación. 3.- Por ende, mayor tiempo de exposición al gluten, aumenta en pacientes celíacos, el riesgo de asociación de IDDM. 4.- En celíacos los IAA serían los mejores marcadores para indicar la posibilidad de desarrollar una futura IDDM.

38. Reducción de los niveles de IgE por administración repetida de *L.casei* en un modelo de hiperreactividad inmune. María E. Bibas Bonet¹, Silvia Fontenla¹, Oscar Mesón¹, Marta Valverde³ y Gabriela Perdigón^{1,2}.

¹Fac. de Bioqca. U.N.T. ²Centro de Referencia para Lactobacilos. ³Fac. de Medicina.
e-mail: perdigon@cerela.org.ar

En trabajos previos se demostró que la administración oral de *Lactobacillus casei* (Lc) inhibía transitoriamente la hiperreactividad inmune en un modelo de alergia experimental (ratón BALB/c) inducido por ovoalbúmina. **Objetivo:** estudiar, en un modelo similar el efecto de Lc en dosis repetidas. **Métodos:** Lc, fue administrado oralmente (10^9 cel/día/ratón), 2 días consecutivos, previos al período de sensibilización y al de reestimulación (Lote A) y al Lote B se le administró otra dosis de Lc posterior a la reestimulación. Se realizaron dosajes periódicos de IgE sérica (ELISA) y se determinó por histoquímica (Alcian blue) el número de mastocitos en tejido bronquial. **Resultados:** el grupo control (G.C.) mostró niveles de IgE entre $32 \pm 5 - 11 \pm 4$ ng/ml en el período post-sensibilización (V.N.: $2 - 4$ ng/ml). Luego del reestímulo, entre $35,8 \pm 3 - 16 \pm 3$ ng/ml. Los niveles de IgE en los lotes A y B fueron significativamente inferiores al G.C. ($10,8 \pm 2 - 4,2 \pm 1,2$ ng/ml) y no hubo diferencias entre ambos. El N° de mastocitos se correlacionó con los niveles de IgE. En el G.C. varió entre $48 \pm 6 - 40 \pm 4$ cel/mm² (V.N.: 20 ± 4). En los lotes A y B variaron entre $25 \pm 4 - 20 \pm 3$ cel/mm², similares al control no sensibilizado. **Conclusiones.** Demostramos la eficacia de la administración de pequeñas dosis repetidas de Lc en la disminución y en el mantenimiento de los niveles de IgE en un modelo de hiperreactividad inmune.

39. Identificación de un alérgeno de soja de reactividad cruzada con caseína de leche bovina. Paula A Rozenfeld, Guillermo H Docena, Marcela Corbetta, Patricia Di Plácido, Carlos A Fossati.

Cátedra de Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP, Htal San Juan de Dios. (paurozen@biol.unlp.edu.ar)

La leche de soja es el sustituto más utilizado en nuestro medio para el tratamiento de pacientes alérgicos a leche de vaca. Pero en muchos casos no se logra una remisión completa de las reacciones alérgicas. Previamente habíamos detectado un componente de 30 kDa presente en la leche de soja que cruza con caseína de leche de vaca (alérgeno principal del sistema), mediante distintos métodos inmunoenzimáticos, empleando un antisuero hiperinmune específico y anticuerpos monoclonales. El objetivo del presente trabajo fue identificar el componente de soja que cruza con leche de vaca y analizar su alergenidad en pacientes alérgicos a leche de vaca. El componente de soja aislado por electroelución se trató con tripsina, y posteriormente se lo purificó por HPLC de fase reversa. Se secuenciaron dos picos y se identificó al complejo como la glicinina A5B3, dos polipéptidos unidos por unión disulfuro. Su alergenidad se determinó mediante su capacidad de unión a la IgE en pruebas *in vivo* (prick test) e *in vitro* (ELISA, EAST) en pacientes diagnosticados como alérgicos a la leche de vaca. En conclusión, se identificó la proteína de soja que cruza con leche de vaca, como la glicinina A5B3. Dicha proteína es alérgica en algunos pacientes alérgicos a leche de vaca. Esta es el primer reporte de reactividad cruzada entre proteínas de soja y leche de vaca.

40. Caracterización fenotípica y expresión de CS-1 fibronectina en células inflamatorias y constitutivas en dermatitis alérgica por contacto. Andrea P. Martín, Elisa Burgos, María E. Cabalier, Susana Ortiz, Silvia Frede, Ernesto Hliba & Horacio M. Serra

Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. U.N.Córdoba hserra@bioclin.fcq.unc.edu.ar

A 15 pacientes con dermatitis alérgica por contacto (DAC) a diferentes agentes (Ag) se les realizó 2 pruebas de parches en la espalda (lesión inducida) con un Ag relevante(+) y uno irrelevante(-). 48 hrs después biopsias de piel obtenidas de ambas zonas y en algunos pacientes de lesiones crónicas se

procesaron para estudios morfológicos e inmunohistoquímicos utilizando Acm contra CS-1 y antígenos leucocitarios. El estudio de las pieles desafiadas con Ag- mostró una mínima tumefacción endotelial y un muy escaso infiltrado mientras que en las lesiones inducidas con Ag+ hubo marcado edema, espongiosis, vesículas, congestión capilar y las células endoteliales presentaron incrementada expresión de CS-1 fibronectina. Debido a que el infiltrado de tipo mononuclear fue perivascular se evaluaron únicamente dichas áreas. En lesiones inducidas e independientemente del Ag, morfológicamente la mayoría de las células fueron linfocitos (Li). Las células fueron fundamentalmente CD8+ (CD4+/CD8+=0,54), en el 50% de los casos predominaron los Li CD45RO+, en el 17% los CD45RA+ y en el resto no hubo diferencias. Hubo un mayor número de células CD11a+ que de células CD11b+ y presencia de algunas células CD106+. En lesiones crónicas la relación CD4+/CD8+ fue de 1,87. Este estudio sugiere que CS-1 podría ser un ligando adicional en la extravasación linfocitaria y que diferentes subtipos de LiT predominan en la dermis de estos pacientes de acuerdo al estado clínico de la enfermedad.

41. Efecto de bacterias lácticas en la inducción de INF- γ e IL-4. Implicancia en el balance TH1/TH2. Medina Marcela¹, Vintiñi Elisa¹ and Perdigón Gabriela^{1,2}.

¹CERELA. ²Cat. Inmunología. Fac. Bqca, Qca y Fcia. U.N.T. (4000). Tucumán. e-mail: perdigon@cerela.org.ar

En estudios previos determinamos que la inmunomodulación de mucosas por BL es dependiente de la cepa. Algunas estimulan la respuesta inflamatoria y otras incrementan la respuesta inmune de mucosas o ambas. Los subsets de LT helper y las citoquinas que ellos inducen determina la naturaleza de la respuesta inmune originada. **Objetivos:** a) Determinar la producción de IL-4 e INF- γ como medida indirecta de la activación de los subset de LT: LTh2 y LTh1 respectivamente por el test de E.L.I.S.A. b) Determinar el efecto de las citoquinas liberadas sobre la activación de macrófagos peritoneales evaluadas mediante ensayos de fagocitosis *in vitro* y producción de radicales oxidantes por reducción de NBT. **Resultados:** a) Todas las BL aumentaron la IL-4, efecto dosis dependiente. V.N.: $6,3 \pm 0,2$, *L. casei*: Valores entre $20 \pm 2,1 - 17 \pm 2$, *L. acidoph.*: $18 \pm 4 - 17,5 \pm 4$, *L. bulg.*: $10 \pm 2 - 11,5 \pm 0,3$, *S. thermoph.*: $11 \pm 1,5 - 10,3 \pm 0,2$, *L. plant.*: $15,5 \pm 0,3 - 10,5 \pm 0,3$. El INF- γ estuvo ligeramente aumentado para algunas BL: V.N.: $7,1 \pm 0,1$, *L. casei*: 2d: 9 ± 1 , *L. bulg.*: 7d: $9 \pm 0,1$, *S.ther.*: 2d: $8,6 \pm 0,3$. Fagocitosis: V.N.: 20 ± 4 , *L. casei*: 2d: 37 ± 3 , *S. therm.*: $2,5,7$ d: 30 ± 3 , *L. bulgar.*: 5d: 31 ± 3 , *L. plant.*: 5d: $34,7 \pm 1$. El NBT estuvo incrementado para todas las BL (V:N: 12 ± 1 , $27 \pm 2 - 40 \pm 3$). **Conclusión:** Los resultados indicarían una activación preferencial de la población Th2 lo que favorecería la respuesta inmune humoral.

42. Alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias de las Placas de Peyer en el estadio inicial de la infección por virus MMTV. Paula Berguer, Julián De Almeida, Virginia Francisco, Pedro Bekinschtein, Gabriela Lombardi, Marcela Peper, Irene Nepomnaschy, Isabel Piazzon.

ILEX-CONICET. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires. (Fax: 4803-9475)

Los virus MMTV son transmitidos por leche y llegan a la glándula mamaria transportados por linfocitos T y B. La activación linfocitaria inducida por el superantígeno (SAg), juega un rol central en el ciclo de vida del virus al favorecer aumentos en la carga viral. Se estudiaron los cambios en las poblaciones linfocitarias durante las primeras etapas de la infección, analizando por citometría de flujo las poblaciones celulares en placas de Peyer (PP) de ratones amamantados durante dos o seis días por nodrizas a) infectadas con MMTV (LA) o b) libres de virus. Los resultados se expresan como la media del por-

centaje \pm DS (n=4) de los grupos a) vs b). Al día 6 de amantamiento se detectó un aumento específico de las células T Vb6+ CD4+ (18.5 \pm 1.2 vs 10.3 \pm 0.8, p<0.01), característico de la respuesta frente al SAg. Al día 2, cuando aún no se detectan aumentos de las células T que reconocen al SAg, se observaron aumentos en el número absoluto y en el porcentaje de linfocitos CD62hi LFAhi (10.9 \pm 0.9 vs 2.3 \pm 0.2, p<0.01) y CD62Lhi b7lo (11.4 \pm 1.2 vs 6.7 \pm 0.6, p<0.01). Las células CD62Lhi y b7lo se encontraron aumentadas tanto en la subpoblación CD4+ como en la B220+. Estos resultados sugieren que la infección con MMTV induce cambios en las subpoblaciones celulares de las PP compatibles con la entrada de células vírgenes a las mismas previamente a la respuesta T al SAg.

43. Linfocitos intraepiteliales intestinales (LIEi) TCRgd+/TNFa+, CD8a/a+ /TNFa+ en modelo de inmunodeficiencia secundaria por malnutrición. Sofía Olmos, Cecilia Frecha, Estela Roux.

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. e-mail: solmos@ffybu.uba.ar

Previamente se demostró en ratas Wistar que al destete recibieron dieta libre de proteínas y luego caseína 20 % durante 21 días (R21), respecto a controles de igual edad (C60): 1) aumento de LIEi CD8a/a+ que coexpresan CD25 y TCRgd, 2) aumento de LIEi TNFa+ y 3) normalización del número de estas células por administración oral del inmunomodulador Timomodulina (TmB) durante el período de renutrición (R21 TmB). Los objetivos de este trabajo fueron -conociéndose que el TNFa produce aumento de células T gd+-: 1) demostrar en LIEi si existe colocalización de los marcadores CD8a/a y TCRgd con TNFa y 2) estudiar el efecto del TmB. Se utilizaron cortes seriados de intestino procesados por la técnica de Sainte-Marie, caracterizándose por inmunofluorescencia doble las células CD8a/a+FITC/TNFa+TRITC y las células TCRgd+FITC/TNFa+TRITC. Resultados (X \pm ES, n=6, C60 vs R21 vs R21TmB): 1) número absoluto de LIEi en 30 campos a) CD8a/a+/TNFa+: 32 \pm 4,1 vs 50 \pm 5,1 vs 32 \pm 4,2; p<0,05 y b) TCRgd+/TNFa+: 30 \pm 3,5 vs 47 \pm 4,2 vs 29 \pm 1,7; p<0,01 (Tukey-Kramer). Conclusiones: 1) la población TNFa+ aumentada en R21 es a su vez CD8a/a+ y TCRgd+ y 2) por efecto del TmB ambas poblaciones disminuyen, siendo los valores en R21TmB comparables a los de C60; por consiguiente el TmB actúa como agente terapéutico. (CONICET PIP4147; UBA TB72)

44. Memoria T en lamina propia intestinal de la rata: efecto de la desnutrición durante la lactancia. Catalina Feledi, Estela Roux*, Ernesto Massouh,

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Inmunoquímica, Departamento de Química Biológica, y *Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Laboratorio de Inmunología Celular, Departamento de Ciencias Biológicas. e-mail: cati@qb.fcen.uba.ar*

La rata desnutrida durante la lactancia por duplicación de camada es transitoriamente inmunodeficiente. El objetivo del presente trabajo fue estudiar en el sitio efector de la respuesta inmune de mucosas- la lamina propia intestinal (LP)- los linfocitos T involucrados. Suspensiones celulares de LP de ratas de diferentes edades se analizaron en citómetro de flujo. La población **CD4+Thy-1+** distingue el linaje T del B. Esta población T es **CD45 RC- (OX22-)** y representa a los "emigrantes recientes del timo" (RTE). En las ratas de 50 días o más, estas células se acumulan en los desnutridos: N=1.41 \pm 1.1 % vs D=3.96 \pm 5.6 % (p=0.17). En unas 2 semanas, RTE maduran en los tejidos, diferenciándose a linfocitos T vírgenes (V), **CD4+Thy-1- OX22 +**. En ratas de 50 días o más, estas células se acumulan en la LP de D :VN=2.2 \pm 3 % vs VD=7.2 \pm 6 % (p=0.048), aunque son solo un 2 y 3.6 % de los linfocitos totales al destete (p=0.52). Estos se distinguen de los de me-

moria (M), **(CD4+OX22-/+)** por la intensidad de expresión de CD45RC, siendo la relación **CD4+ M/V**, en las ratas N de 50 días o más, mayor que en las D (95.9 \pm 166 vs 16.4 \pm 23)(p=0.11). Dado que no hay aumento significativo de la población CD4+ total: N=14.6 \pm 11 vs D= 12.7 \pm 6.4 (p=0.53) en todo el rango de edades estudiado, se concluye que la progresión de T vírgenes a T de memoria en la LP de los desnutridos está inhibida . PICT97 01755, UBA98 TX026, CONICET PIP98.

45. Efecto inmunológico del yogur adicionado a una dieta de renutrición en un modelo experimental de desnutrición. Gauffin Cano, Paola¹; Agüero, Graciela¹ y Perdígón, Gabriela^{1,2}.

¹CERELA. ²Cat. Inmunología, Fac. de Bqca, Qca. y Fcia. de la UNT(4000)Tucumán. e-mail: perdigon@cerela.org.ar

En la desnutrición el SI y la función de barrera de la mucosa intestinal se encuentran muy comprometidos. El yogur es ampliamente conocido por sus propiedades nutricionales e inmunopotenciadoras. **Objetivos:** estudiar el efecto benéfico del yogur adicionado a una dieta de renutrición en un modelo experimental de desnutrición sobre el sistema inmune de mucosa intestinal y en la recuperación de la barrera intestinal. Ratonés BALB/c fueron desnutridos por déficit proteico no vitamínico (D) y renutridos (Ren) durante 7d. A ambos grupos se les adicionó a la dieta yogur diluido al 1/2 (Yo1/2) y sin diluir durante 2, 5 y 7 d consecutivos. Se determinó: 1) Cels. IgA+, IgG+ e IgM+ (IFD), mastocitos (M) y cels. calciformes (CC) (AlcianBlue-Safranina) asociados a lámina propia de intestino delgado, 2) Estudio ultraestructural por MET, y 3) Nivel de IgAs-anti salmonella por ELISA. **Resultados:** se seleccionó como dosis óptima Yo1/2 durante 5 d. Para la misma se observó incremento de IgA+ (Bioterio=86 \pm 3; D=44 \pm 3; Ren=80 \pm 3; Ren+5dYo1/2=85 \pm 2 cels/10cpos 100X), CC y recuperación del epitelio (MET). No hubo modificaciones en cels. IgG+, IgM+ y M. Los valores de IgAs a-salm. aumentaron (B=63,9 \pm 14; D=47 \pm 9; Ren=14,8 \pm 10; Ren+5dYo1/2= 193,3 \pm 11DO/200mL). **Conclusiones:** El yogur en una dieta de Ren favorece la recuperación de la función inmune intestinal.

46. Linfocitos T y B en el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT) en modelo de inmunodeficiencia secundaria por malnutrición. Gustavo Sosa, Estela Roux.

Laboratorio de Inmunología Celular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. e-mail:gsosa@ffybu.uba.ar

Estudios previos realizados en ratas Wistar sometidas a desnutrición proteica severa al destete y renutridas con caseína al 20 % durante 21 días (R21) mostraron alteraciones en las poblaciones T y B de las mucosas intestinal y bronquial. El objetivo de este trabajo fue determinar si estas poblaciones están alteradas en el NALT. Se usaron como controles ratas de igual edad alimentadas con dieta comercial (C). El tejido fue procesado por la técnica de Sainte-Marie y se caracterizaron las poblaciones T CD5+, CD4+ y CD8a+ y las B OX-33+, IgA+ e IgM+ por inmunofluorescencia indirecta sobre cortes seriados del NALT. Resultados (X \pm E.S. número de células en 5 campos, n=5, R21 vs C). Se observaron diferencias significativas en las poblaciones T CD5+ (47,3 \pm 1,2 vs 91,3 \pm 4,8, p<0,001) y CD4+ (39,0 \pm 3,4 vs 50,8 \pm 3,7, p<0,05) pero no en la subpoblación CD8a+ (47,0 \pm 5,8 vs 43,4 \pm 4,4, p=n.s.). Respecto a los linfocitos B, no se observaron diferencias significativas en las tres poblaciones estudiadas (OX-33: 50,7 \pm 1,9 vs 51,4 \pm 3,1; IgA: 38,0 \pm 6,7 vs 29,8 \pm 3,9, p=n.s.; IgM: 39,8 \pm 3,0 vs 47,2 \pm 4,0, p=n.s.). Conclusión: a diferencia de lo que ocurre en intestino delgado y en bronquios, el déficit proteico severo al destete provoca solamente alteraciones significativas en el número absoluto de linfocitos T y en la subpoblación T colaboradora. (CONICET PIP 4147, UBA TB72).

SISTEMA CARDIOVASCULAR I

- 47. Aplicación de un método para evaluar la susceptibilidad a la oxidación de LDL en el laboratorio clínico general.** Adriana Scoccia, María Molinuevo, Antonio McCarthy, Ana Cortizo.

Bioquímica Patológica. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
e-mail: ascoccia@biol.unlp.edu.ar

Las modificaciones oxidativas de las LDL son consideradas como uno de los procesos más importantes involucrados en la aterosclerosis. Un método in vitro estandarizado para su medida y de aplicación en el laboratorio clínico de rutina, podría ser de gran relevancia clínica. Usualmente las LDL se preparan por ultracentrifugación, un método no accesible a los laboratorios de rutina, mientras que la LDL oxidada se ha evaluado por diferentes métodos con gran variabilidad. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y evaluar un método de susceptibilidad a la oxidación de LDL aplicable en el laboratorio clínico. Se tomaron muestras de sangre con heparina de 52 individuos sanos de ambos sexos y de pacientes diabéticos. La LDL se aisló por precipitación selectiva con polímeros anfipáticos y la susceptibilidad a la oxidación por $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ se evaluó a través de TBARS. La recuperación fue de 87-95%, el CV intra-ensayo 5% e inter-ensayo 8%, la media \pm SEM para la población normal fue de 21.7 ± 1.5 y para los pacientes diabéticos de 39 ± 4.5 nmol MDA/ mg proteína LDL. Los valores de LDL oxidada basal se hallan en el límite de detección del método. Este método puede ser útil para la determinación de la susceptibilidad a la oxidación de LDL en el laboratorio clínico de baja complejidad, en particular en poblaciones de alto riesgo.

- 48. Participación del retículo sarcoplásmico en la respuesta contráctil a 4-aminopiridina en aorta de rata.** Jessica Raingo, Verónica Milesi, Alicia Gómez Alvis, Alejandro Rebollo, Francisco Speroni, Angela Grassi.

Anatomía y Fisiología. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. (agrassi@nahuel.biol.unlp.edu.ar).

La 4-aminopiridina (4-AP) es un bloqueante específico de los canales de potasio rectificadores tardíos (K_{DR}) y produce contracción en varios tipos de músculo liso. En otros tipos de células se han descrito efectos de 4-AP independientes del bloqueo de los K_{DR} , por lo que estudiamos en este trabajo mecanismos alternativos mediante los cuales pueda inducir contracción. En anillos de aorta de rata precontraídos con CIK 40 mM comparamos la respuesta contráctil de 4-AP con la inducida por CINH_4 20 mM, dado que ambos son bases débiles. El CINH_4 contrae en forma transitoria (18 ± 2 gF/gP, $n=7$) y el pretratamiento con rianodina 10 μM (Ry), que suprime el aporte de Ca^{2+} de depósitos intracelulares, inhibe completamente esta respuesta ($n=7$). La 4-AP 5 mM contrae en forma sostenida y la Ry inhibe parcialmente este efecto (73 ± 7 gF/gP, $n=6$, vs 33 ± 7 gF/gP, $n=6$, $p<0,01$ test de Student, muestras independientes). Cuando los anillos se precontraen con tetraetilamonio 20 mM (TEA), que bloquea la mayor parte de los canales de K, la respuesta contráctil a 4-AP también es sensible a Ry (66 ± 13 gF/gP, $n=10$, vs 31 ± 7 gF/gP, $n=8$, $p<0,05$ test de Student, muestras independientes). Se concluye que la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares sensibles a Ry contribuye a la contracción que la 4-AP produce en la aorta de rata, efecto similar al observado para la contracción inducida por el CINH_4 , lo cual sugiere que podría estar mediado por alcalinización intracelular.

- 49. Participación del óxido nítrico en el modelo de hipertensión por nefrectomía subtotal en rata.** Andrea

Fellet, Analía Tomat, Paola Mauricio, Laura González Bosc, Marcos Ragoni, Angeles Costa, Cristina Arranz, Ana Balaszczuk.

Cátedra de Fisiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. IOUIMEFA - PROSIVAD - CONICET. (abalasz@huemul.ffyb.uba.ar).

El objetivo fue evaluar el sistema del ON en el modelo de hipertensión por nefrectomía subtotal (se extrae el 75% de la masa renal) y sobrecarga salina (vía oral) en ratas, durante cuatro semanas (S1,2,3,4). Se determinaron semanalmente la presión arterial sistólica (PAS) indirecta y los nitritos y nitratos urinarios (NOx). Al final de S4 se obtuvieron dos grupos: A) Se determinó la actividad de NADPHd indicadora de la actividad de la ON sintetasa (ONS) en aorta torácica; B) Se registraron la PAM directa y FC luego de un bolus de L-NAME (5mg/kg). De acuerdo a la PAS (mmHg) los animales se dividieron en: normotensos (N ($n=6$): 126 ± 6) e hipertensos (H ($n=8$): 160 ± 11 , $p<0.01$). A partir de la segunda semana se observó un aumento de la NOx (nmol/min/100g) en H comparado con N (S1: $N=0.39 \pm 0.03$ vs $H=0.50 \pm 0.05$, S2: $N=0.49 \pm 0.04$ vs $H=1.41 \pm 0.14^*$, S3: $N=0.29 \pm 0.05$ vs $H=1.51 \pm 0.08^*$, S4: $N=0.20 \pm 0.04$ vs $H=0.56 \pm 0.10^*$, $*p<0.01$). A) En H la actividad NADPHd aumentó en músculo (DO: $N=0.172 \pm 0.005$ vs $H=0.188 \pm 0.005^*$) y endotelio (DO: $N=0.169 \pm 0.005$ vs $H=0.192 \pm 0.009^*$) vs N ($*p<0.005$). B) No hubo diferencias en la PAM ni en la FC post-L-NAME entre H y N. El aumento de NOx y de la actividad ONS se observa sólo en los animales que desarrollan hipertensión. Esto indicaría que la vía del ON forma parte de mecanismos compensatorios que se ponen en juego para contrarrestar el estado hipertensivo.

- 50. La Endotelina 3 (ET-3) inhibe el cotransportador Na^+ -glucosa (SGLT1) a través del óxido nítrico (NO).**

Laura González Bosc, Mónica Majowicz, María del Carmen Ortiz, Norberto Vidal.

Biología Celular e Histología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
e-mail: lgbosc@ffyb.uba.ar).

Dado que la ET-3 inhibe la absorción de Na^+ a través del intestino delgado de rata, nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la ET-3 sobre el SGLT1 del intestino delgado y si el NO participa del mismo. Para ello usamos segmentos de intestino delgado provenientes de ratas Wistar macho. Se determinó la diferencia de potencial transepitelial (DP) y la corriente de cortocircuito (Isc) con la técnica de *clampeo* de voltaje en cámara de Ussing. Los experimentos se hicieron con y sin glucosa (CG; SG) en la solución Krebs de ambas hemicámaras. En los experimentos CG la ET-3 0.1 μM disminuyó la DP y la Isc ($\text{DP}=59.2 \pm 7.6\%$, $\text{Isc}=74.1 \pm 8.6$, $p<0.05$), mientras que no hubo cambios en los SG. El pretratamiento con flordizina 0.1 mM, bloqueante del SGLT, inhibió el efecto de la ET-3 sobre la Isc y produjo un retraso de su efecto sobre la DP. El pretratamiento del tejido con azul de metileno (AM) 0.1 mM y con L-NAME 0.1 mM, inhibidores de la guanilato ciclasa soluble y de la NO sintasa respectivamente, produjo un retraso de 15 min en el efecto de la ET-3 sobre la DP y la Isc. La actividad de la NADPH diaforasa del epitelio intestinal, marcador de la actividad de la NO sintasa, aumentó de 0.22 ± 0.01 (densidad óptica control) a 0.27 ± 0.01 (densidad óptica ET-3). Estos resultados muestran que la ET-3 inhibe al SGLT1 y que ese efecto es mediado, al menos en parte, por el NO.

- 51. El Precondicionamiento Isquémico Clásico Protege Contra el Atontamiento Cardíaco en Ovejas Consientes.** Héctor del Valle, Elena Lascano, Jorge Negroni, Alberto Crottogini.

Departamento de Ciencias Fisiológicas, Farmacológicas y Bioquímicas. Universidad Favaloro. Buenos Aires.
e-mail: delvalle@favaloro.edu.ar

Introducción: la protección del preconditionamiento clásico (PC) ó de primera ventana contra el infarto está por demás documentada; sin embargo, existen dudas respecto de la protección que el PC podría tener sobre el atontamiento cardíaco. **Objetivo:** determinar si el PC protege contra el atontamiento en ovejas conscientes. **Métodos:** Los animales se instrumentaron con sensores de presión ventricular, un oclisor coronario y un par de cristales piezoeléctricos para medir espesor parietal. Luego de los registros basales se realizó una isquemia de 12 min. seguida de 2 hs de reperfusión en los grupos control (C, n=7) y con PC (n=8); en éste último la isquemia fué precedida de 6 episodios breves de isquemia-reperfusión de 5min c/u. En ambos grupos se midió la recuperación mecánica como fracción de espesamiento parietal (FEP). **Resultados:** la recuperación (Media \pm SE) de la FEP medida durante la isquemia y reperfusión (R) como porcentaje con respecto al basal (100%) muestra:

Grupo	Basal	Isquemia	R 30'	R 60'	R 90'	R 120'
C	100	-30 \pm 16	21 \pm 6	48 \pm 3	72 \pm 1	82 \pm 3
PC	100	-10 \pm 13	54 \pm 14 \ddagger	70 \pm 17 \ddagger	89 \pm 15*	87 \pm 13

Test de t: *p<0.02, \ddagger p<0.01 y \ddagger p<0.001 PC respecto de Cont.

Conclusión: En ovejas conscientes el PC protege contra la disfunción contráctil postisquémica (atontamiento cardíaco).

52. Efecto de la inhibición de la angiotensina II durante el proceso de envejecimiento de la rata sobre la actividad de las enzimas antioxidantes de corazón.

Lidia Costa, Pablo La Padula, Silvia Lores Arnaiz, Gabriela D'Amico, Alberto Boveris, Nidia Basso.

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, y Laboratorio de Radicales Libres, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. e-mail: lidiaecosta@yahoo.com

Se ha sugerido que el aumento de actividad de enzimas antioxidantes (EAO) encontrado en tejidos de ratones tratados durante 9-11 semanas con el inhibidor de la enzima convertidora enalapril, de ser perdurable, explicaría la mayor supervivencia y la protección tisular conferida por 24 meses de tratamiento. El objetivo del presente estudio fue investigar si la inhibición del sistema renina-angiotensina en la rata hasta la senectud altera el comportamiento normal de las EAO cardíacas durante el proceso de envejecimiento. Se usaron 48 ratas Wistar machos que se dividieron en 3 grupos, a los que se administró como bebida agua (C), agua conteniendo enalapril (E), o losartán (L), ambos a la dosis de 10 mg/kg/día. Mitad de los animales se estudiaron a los 6 meses y el resto a los 18. Por métodos espectrofotométricos se determinó la actividad de EAO en homogeneizados de ventrículo izquierdo de todos los grupos. En los de 6 meses se midió además la producción de NO, de H₂O₂, y la actividad de MnSOD en mitocondrias aisladas. En C sólo la SeGPx (U/g tejido) disminuyó con la edad: 11.2 \pm 0.6 vs 8.2 \pm 0.7. A los 6 meses en E disminuyó la MnSOD, tanto en el homogeneizado (U/mg tejido): C 0.34 \pm 0.03, E 0.20 \pm 0.02, como en las mitocondrias (U/mg proteína): C 2.6 \pm 0.3, E 1.7 \pm 0.1, y la catalasa (pmol/g): C 36.8 \pm 3.0, E 22.4 \pm 3.1, y aumentó la producción mitocondrial de NO (nmol/min/mg prot.): C 0.22 \pm 0.03, E 0.36 \pm 0.04. En L disminuyó la catalasa L 23.8 \pm 1.8, y en mitocondrias la MnSOD: L 0.9 \pm 0.1 y la producción de H₂O₂ en presencia de succinato-antimicina (nmol/min/mg prot): C 0.98 \pm 0.10, L 0.60 \pm 0.02. A los 18 meses se recuperó la actividad normal de MnSOD y catalasa en E y L y sólo en L se observó una disminución de SeGPx de similar magnitud que en C (30 %). En todos los casos p < 0.01. A las dosis utilizadas E mostró un efecto protector superior a L. Los resultados

indican que éste no estaría vinculado a un aumento de EAO y sugieren que la NOS mitocondrial tendría un papel relevante.

53. Polimorfismos de la apolipoproteína CIII (APO CIII) en relación a la presencia ó no de enfermedad vascular aterosclerótica (EVA). Virginia Bañares^{1,2}, Graciela Peterson², Marcelo Espeche², Elías Sisú³, Ricardo Gulayin³, María Bravis⁴, María Ruiz⁴, Omar Pivetta¹, Julio Tavella^{2,5}.

¹Centro Nacional de Genética Médica, Buenos Aires.

²Programa de Prevención del Infarto en la Argentina, CIC, UNLP; ³Servicio de Hemodinamia del Instituto del Tórax; ⁴Laboratorio Hospital San Juan de Dios;

⁵INIBIOLP, CONICET, La Plata. (4801-4428 e-mail: vb@genes.gov.ar

Apo CIII interviene en la regulación del metabolismo de partículas ricas en triglicéridos (TG). Altos niveles de TG en el plasma son un factor de riesgo de EVA. Recientemente hemos demostrado que pacientes con aterosclerosis, muestran un aumento significativo de apo CIII en plasma respecto de controles sin lesión, independientemente de los niveles de lípidos plasmáticos. El objetivo de presente trabajo es determinar la distribución del polimorfismo para la enzima Sst I en la región 3' no codificante del gen de la apolipoproteína CIII entre estos dos grupos. Fueron analizadas 153 muestras de pacientes con lesión y 74 sin lesión aterosclerótica coronaria objetivada por angiografía. Se determinaron los valores medios de concentración plasmática de TG y colesterol HDL. La distribución de genotipos entre ambos grupos (con y sin lesión), tomados en su totalidad o cuando fueron divididos según el sexo o la edad no muestran diferencias significativas. Cuando se analizaron los resultados en varones menores de 60 años se observó que la media de los valores de TG resulta significativamente mayor en el grupo con lesión, a la vez que este aumento de TG se correlacionó con la presencia del alelo S2 (p=0.017). Estos resultados sugerirían que la hipertrigliceridemia en los individuos lesionados obedecería al menos en parte a un origen genético.

54. Relación del fibrinógeno y del TNF-alfa con lesiones histopatológicas en aorta de ratas. Mónica Moya, Vilma Campana, Antonio Gavotto, Juan Simes, Luis Spitale, José Palma.

Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

e-mail: monicamoya@hotmail.com

Títulos elevados en plasma de fibrinógeno (F) y presencia de Factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) se relacionan con enfermedad isquémica vascular, siendo desconocido el efecto a nivel de las arterias. Se estudió en plasma F y TNF-alfa en ratas sometidas a injurias tisulares durante 30 y 60 días (lote II y III) y se analizó por anatomía patológica (AP) las posibles lesiones en la aorta torácica. Fibrinógeno(mg/100ml) se dosó por espectrofotometría y TNF-alfa(pg/dl) por Elisa. La AP se estudio por M O. Se observó un incremento significativo de F en (III) (358.7 \pm 9.97) comparado con el control (207.0 \pm 3.04) (p<0.001) y con el grupo (II) (336.6 \pm 7.57) (p<0.01). El grupo (II) presentó aumento significativo con respecto al control (p<0.001). TNF-alfa presentó un aumento significativo en el lote (II)(68.7 \pm 4.6) y (III) (66.4 \pm 1.7) comparado con el control (35.7 \pm 2.5) (p<0.001). En (II), el 90 % de los cortes mostraron denudación endotelial y engrosamiento de la íntima. En (III), se observó denudación endotelial, protusiones de la capa endotelial hacia la luz y cambios mixoides subendoteliales en el 95% de los cortes. Al comparar los lotes (II) y (III) con respecto al control se obtuvo una diferencia significativa (p<0.001).La hiperfibrinogenemia genera denudación endotelial, con la consiguiente disfunción reflejada en las variaciones de F y TNF-alfa mediadores del proceso inflamatorio que acompañaría a la aterosclerosis.

HEMATOLOGIA I

55. Marcadores de estrés oxidativo en anemias microcíticas. Llesuy Susana^a, Polo José^a, Repetto Marisa^a, Faure Albanese Trinidad^a, Canelejo Katia^b, Speroni Javier^b, Aixala Mónica^b.

^a *Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.* ^b *División Laboratorio. A. N. M. Grupo cooperativo de hemoglobinopatías.*
e-mail: sllesuy@hemul.fyb.uba.ar

Los eritrocitos normales están protegidos por sistemas endógenos contra el posible daño que puede generar la combinación de la presencia de oxígeno y de Fe. La microcitosis es una fisiopatología que produce una reducción del contenido de hemoglobina, ya sea por defectos en la síntesis del hemo o en las cadenas de globinas. El objetivo de este trabajo es evaluar los marcadores de estrés oxidativo en dos tipos de anemias microcíticas. Se trabajó con 3 grupos de 12 personas cada uno (normales, β -talasémicos, ferropénicos). Se les extrajo sangre heparinizada y se separó el paquete globular, donde se evaluaron los siguientes marcadores de daño oxidativo: 1) quimioluminiscencia iniciada por hidropéroxido de tert-butilo (QL), 2) actividad de superóxido dismutasa (SOD) y 3) niveles de glutatión (GSH). La QL se encontró aumentada en un 36% (C:1435 \pm 92 cps/mg) en los pacientes ferropénicos y no mostró cambios en los talasémicos; se observó un aumento en la SOD en los 2 tipos de anemia, siendo de un 49% para los pacientes talasémicos y de un 51% para los ferropénicos (C:1,35 \pm 0,08 U/mg). La evaluación de los niveles de GSH mostró un 60% de disminución para la talasemia y un 33% para los ferropénicos (C:35,8 \pm 4,7 μ M). Los resultados sugieren la existencia de patrones diferentes al estrés oxidativo entre las 2 microcitosis estudiadas.

56. El aluminio interfiere con la captación de hierro y afecta la síntesis de hemoglobina en células K562.

Gladys Pérez, Graciela Garbossa, Cecilia Di Risio, Daniela Vittori, Alcira Nesse.

Laboratorios de Análisis Biológicos y de Radioquímica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. gperez@qb.fcen.uba.ar

El receptor para transferrina de las células K562 posee afinidad similar por TfFe₂ o TfAl₂. Para analizar si, por ello, el Al interfiere con la incorporación de Fe, las células fueron inducidas con hemina (H) o butirato de Na (B) en presencia de TfAl₂ y Tf⁵⁹Fe₂ durante 4 ó 24 h. Se midió ⁵⁹Fe en el paquete celular y en el hemo después de extracción con ciclohexanona. Se efectuaron los controles correspondientes. Los resultados se expresan como % vs. los controles sin Al. La captación total fue menor en presencia de Al: 4h: H 67 \pm 3, B 61 \pm 1; 24h: H 81 \pm 4, B 78 \pm 4. Igual tendencia mostró la incorporación al hemo: 4h: H 77 \pm 5, B 62 \pm 9; 24h: H 82 \pm 3, B 88 \pm 5. Resultados similares de Fe total fueron obtenidos en presencia de Al durante un pulso de 4h de Tf⁵⁹Fe₂ luego de 72 h de inducción. Cuando Al fue removido, la captación total alcanzó o superó los niveles de los propios controles: 24h: H 107 \pm 1, B 121 \pm 8; 72h: H 143 \pm 2, B 100 \pm 7. La incorporación al hemo dependió del inductor: 72h+Al: H 124 \pm 5, B 45 \pm 5; 72h-Al: H 188 \pm 9, B 87 \pm 10. TfAl₂ inhibió la hemoglobinización: H 80 \pm 1,8%; HAl 65 \pm 2,0% (p<0,01); B 30 \pm 1,8%; BAl 13 \pm 2,0% (p<0,05). Concluimos que Al interfiere con la captación de Fe. La inhibición de la hemoglobinización se debería a disminución de la síntesis de hemo o alteración de su utilización para la síntesis de hemoglobina, según el inductor utilizado.

57. Inhibición del desarrollo de CFU-E y alteraciones de banda 3 de eritrocitos provocadas por aluminio en células humanas. Daniela Vittori, Graciela Garbossa, Carlos Lafourcade, Gladys Pérez, Alcira Nesse.

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
e-mail: garbossa@qb.fcen.uba.ar

La acumulación de aluminio (Al) se ha asociado con la aparición de signos de anemia. Los resultados obtenidos en animales sugieren que la acción tóxica por Al afecta a células eritroides inmaduras y maduras. El objeto de este trabajo fue determinar la acción de Al sobre células de origen humano. Concentrados de células progenitoras eritroides, obtenidos de sangre periférica, fueron inducidos por eritropoyetina (Epo). Los resultados (M/Rango) expresados como número de CFU-E/10⁶ células mostraron que Al produce una disminución significativa de CFU-E. Epo: 12800/11200-16300; Al: 8750/6560-9240 (p<0,05). Eritrocitos de sangre periférica humana fueron incubados con Al 14 días a 4°C. Por PAGE y western blot de proteínas de membrana eritrocitaria no se detectaron cambios en actina y espectrina. El análisis con anti-banda 3 mostró diferente concentración relativa de las bandas reactivas, con disminución del mayor componente de la banda 3 y aumento de proteínas de menor Mr. Conclusiones: a) Al inhibe el desarrollo de células progenitoras eritroides humanas, b) Al interaccionaría con componentes de la membrana celular, provocando cambios estructurales en las proteínas, los que serían responsables de las alteraciones morfológicas que previamente hemos observado por microscopía electrónica de barrido en eritrocitos de animales intoxicados con Al.

58. Expresión de óxido nítrico sintetasa en células U-937. Noemí Zanaro, Ana Ortalli, Susana Ouviaña, Beatriz Sasseti.

Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
e-mail: sasseti@qb.fcen.uba.ar.

En la diabetes pueden acumularse excesivamente productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) produciendo disfunción tisular y endotelial, reacción inflamatoria y activación del sistema monocito-macrófago. Estudiamos el rol de los AGEs en la inducción de óxido nítrico sintetasa (NOSII) en células U937 diferenciadas a macrófagos. Se cultivaron 2x10⁵ células/mL en RPMI 1640, 10% SFB y antibióticos en presencia de dimetil-sulfóxido (DMSO) 1% durante 48 hs a 37 °C y 5% CO₂. Los recuentos celulares demostraron 50% menos crecimiento en células U-937 tratadas con DMSO respecto de los controles. La viabilidad celular fue >95% en todos los casos (Trypan blue). Se agregó albúmina sérica bovina glicosilada al medio de cultivo (AGE-BSA) 50-250 μ g/mL (Unidad fluorescente arbitraria >80/ 100 μ g proteína) durante 24 hs. Se trató con LPS 1 μ g/mL y INF γ 50U/mL. Se midieron los niveles de nitritos en los sobrenadantes de cultivo a las 24 hs (reactivo de Griess). El nivel de nitritos obtenidos en U-937 tratadas con AGE-BSA (250 μ g/ml) fue 300% mayor que el obtenido con células U-937 en presencia de BSA. El lisado de células tratadas con AGE mostró NOSII por Western blot. Este resultado indicaría que la diferenciación morfológica de U-937 a macrófagos, observada por microscopía óptica, se acompaña de la funcional, haciéndose sensibles a la acción de AGE-BSA y produciendo niveles altos de óxido nítrico vía activación de NOSII.

59. Análisis de la adhesión de plaquetas a leucocitos polimorfonucleares mediada por la glicoproteína Ib. Norma Maugeri, Victorio Pozo Devoto, Ana Kempfer, Roberto Pozner, Mirta Schattner, María Lazzari.

Departamento de Hemostasia y Trombosis. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires
e-mail: maugeri@connmed.com.ar

Previamente hemos demostrado que los PMN presentan factor von Willebrand (vWF) y que las plaquetas utilizan la glicoproteína (GP) Ib para unirse a los PMN. El objetivo de este trabajo fue discriminar si durante la formación de agregados

dos de plaquetas y PMN (APP) la GPIb se une al vWF leucocitario o al dominio I del Mac-1 (CD11b/CD18) que es homólogo al dominio A1 del vWF. La presencia de vWF en los leucocitos se confirmó por Western blot en muestras de PMN lisados. La formación de APP (n=4) se determinó en muestras de 5×10^6 PMN/mL y 2×10^6 plaquetas/mL (3 min, 37°C, shear rate 250 s^{-1}) por citometría de flujo, expresando los resultados como el % de plaquetas unidas a PMN (media \pm SEM). Las muestras fueron incubadas previamente (10 min) con diferentes bloqueantes: MoAb SZ2 (bloqueante de GPIb), MoAb SZ22 (control de SZ2), MoAb ICFR44 (bloqueante de Mac-1), MoAb7E4 (bloqueante del dominio I del CD18) o con ácido aurin tricarbóxico (ATA), inhibidor de la unión de la GPIb-vWF. El porcentaje de APP fue: control 23 ± 7 , con SZ2 = 5 ± 2 ($p < 0.005$); con SZ22 = 17 ± 5 ; con ICFR44 = 19 ± 4 ; con 7E4 = 22 ± 3 ; con ATA 5 μM y 10 μM 10 ± 2 y 5 ± 1 , respectivamente ($P < 0.05$). Los resultados indican que, en nuestras condiciones, las plaquetas se unen al vWF leucocitario a través de la GPIb, no involucrando al dominio I del CD11b/CD18.

60. Estudios moleculares del factor Von Willebrand.
Gonzalo Carballo, Cristina Farías, María Silaf, Patricia Casais, Ana Kempfer, María Lazzari.

Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. CONICET.
e-mail: carballo@connmed.com.ar.

El factor von Willebrand (vWf) es una glicoproteína multimérica que circula en plasma unida no covalentemente al Factor VIII. La enfermedad de von Willebrand (vWD) tipo 2N es causada por mutaciones en el gen del vWf que resultan en una concentración normal pero con una capacidad disminuida de unión al factor VIII. Para identificar una potencial anomalía en el vWf responsable de los niveles discordantes del FVIII observados en 41 pacientes, examinamos los exones 18 y 20 del gen del vWf por secuenciación del ADN. No encontramos las mutaciones C2344T, G2354A, G2359A ni C2372T del exón 18 en 27 pacientes estudiados. No encontramos las mutaciones G2561A, G2573T ni G2635A del exón 20 en 18 pacientes estudiados. La secuenciación del exón 18 de muestras de ADN de 27 pacientes muestra la presencia del polimorfismo T/C en la posición 2386, con una frecuencia de alelo de 0.93/0.07 y del polimorfismo A/G en la posición 2366, con una frecuencia de alelo de 0.46/0.54. La secuenciación del exón 20 en muestras de ADN en 18 pacientes evidencian el polimorfismo G/A en la posición 2555 con una frecuencia de alelo de 0.91/0.09. La frecuencia del polimorfismo T/C en la posición 2386, del exón 18 es común en la población mundial. La del polimorfismo A/G en la posición 2366, concuerda con la encontrada en la población vasca. La frecuencia del polimorfismo G/A en la posición 2555 concuerda con la de la población blanca norteamericana.

61. Relación entre los niveles del receptor soluble de transferrina (TfRs) y el factor de necrosis tumoral (TNF α) en pacientes anémicos con procesos sépticos. Claudio Carbia, Mabel Lardo, Norma Cantenys, Amalia Merelli, Norma Diaz.

Departamento de Bioquímica Clínica. Sección Hematología - Facultad Farmacia y Bioquímica - UBA.
e-mail: nbdiaz@dbc.ffyb.uba.ar.

La anemia de los pacientes con sepsis se incluye dentro de la anemia de los procesos crónicos (APC), observándose una eritropoyesis con mala utilización del hierro a nivel eritroblástico. Se ha establecido que a diferencia de las anemias ferropénicas donde el TfRs está aumentado, en estos procesos dicho receptor no se modificaría debida a la acción inhibitoria de ciertas citoquinas principalmente del factor de necrosis tumoral (TNF α). Se estableció la correlación entre estos dos parámetros (TNF α y TfRs) en este tipo de pacientes. Para su determinación se utilizó un enzimoimmunoensayo en

microplaca. Se realizó el dosaje de TfRs y el de TNF α en 30 sujetos sanos (Grupo control) y en 20 pacientes sépticos que presentaban anemia con Hb menor de 12g/dl. Los resultados obtenidos fueron: Grupo control: (X \pm ES): TfRs = 16.86 ± 1.28 nmol/L y de TNF α = 2.35 ± 0.25 pg/ml. Pacientes con sepsis: (X \pm ES) Ferremia = $39.21 \mu\text{g/dl}$, Índice de saturación = $0.22 \pm 0.03\%$, Ferritina sérica = 639.5 ± 97.4 ng/ml, TNF α = 4.32 ± 0.53 pg/ml y TfRs = 16 ± 1.37 nmol/L. Cuando se comparó el TNF α del grupo control vs pacientes sépticos se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$). Se concluye que en estos pacientes con anemia sideropénica y TfRs normal (APC), el TNF α por sí sólo no sería sensible para evaluar un efecto inhibitorio sobre la expresión del TfRs.

PROLIFERACION Y MUERTE CELULAR

62. Ciclo celular de dos poblaciones de *Trypanosoma cruzi* de diferente virulencia y tropismo. Gerardo A. Mirkin, Stella M. González Cappa.

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. e-mail: gmirkin@fmed.uba.ar

La velocidad de multiplicación de los amastigotes de *Trypanosoma cruzi* puede incidir en las diferencias de letalidad comunicadas, para las cepas RA (alta virulencia) y CA-I clon K98, (baja virulencia) en el modelo murino de enfermedad de Chagas. Previamente observamos mediante microscopía que el aumento de amastigotes en función del tiempo es mayor para RA que para K98 en células infectadas *in vitro*. En este trabajo analizamos el ingreso a G0/G1, S y G2/M, de amastigotes de RA y K98, mediante «pulse-chase» con BUDR (2, 4 y 6 horas) y FACS. Los datos se compararon mediante ANOVA de dos vías con replicación ($p < 0.05$), para determinar diferencias en la cinética de ingreso a las distintas fases del ciclo celular, de los amastigotes de las cepas estudiadas. El análisis de la relación BUDR-/BUDR+ mostró aumento de la fracción no marcada de amastigotes en S para RA y reducción para K98 en función del tiempo (RA vs K98; 2 hrs.: 0.61 ± 0.05 vs 3.52 ± 0.31 , $p < 0.0001$; 4 hrs.: 2.29 ± 0.43 vs 0.99 ± 0.28 , $p < 0.02$; 6 hrs.: 9.26 ± 1.16 vs 1.24 ± 0.02 , $p < 0.0002$; datos de 3 experimentos). Un patrón similar se observó para las otras fases estudiadas. Los resultados confirman que RA tiene un tiempo de duplicación menor que K98. Esto, sumado al tropismo tisular más diverso de la primera, explicaría su mayor virulencia. Financiado por FONCyT y Universidad de Buenos Aires.

63. El óxido nítrico (NO) afecta la viabilidad de las células adenohipofisarias de rata. Miguel Velardez, Beatriz Duvilanski.

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.
e-mail: neuroend@fmed.uba.ar

Diversas evidencias indican que el NO se comporta como citotóxico y/o citoprotector en distintos tejidos. Este estudio tiene como objetivo examinar el efecto del NO sobre la viabilidad celular en células adenohipofisarias en cultivo provenientes de ratas hembras. Como índice de viabilidad se midió la actividad deshidrogenasa mitocondrial (AC). Las células fueron incubadas durante 48 hs con DETA NONOato (DETA, 1 mM), dador de NO. El DETA disminuyó marcadamente tanto la AC (absorbancia a 600 nm) como la liberación de prolactina y LH (RIA, ug/well). Estos efectos no fueron observados con DETA sin capacidad de liberar NO (DETA-D, 1 mM). AC: Control: 0.297 ± 0.006 , DETA: $0.188 \pm 0.009^*$, DETA-D: 0.316 ± 0.008 , $*p < 0.01$ vs control. Prolactina: Control: 2.25 ± 0.24 , DETA: $0.67 \pm 0.09^*$, DETA-D: 2.04 ± 0.12 , $*p < 0.01$ vs control. LH: Control: 1.30 ± 0.05 , DETA: $0.57 \pm 0.05^*$, DETA-D: 1.28 ± 0.04 , $*p < 0.01$ vs control. L-NAME no afectó la AC ni la liberación de

prolactina después de 48 hs de incubación. Tiempos menores de exposición al DETA también afectaron la actividad celular (1 a 24 hs). Estos resultados indican que el NO produciría cambios metabólicos que llevan a una disminución de la viabilidad celular, sugiriendo un papel citotóxico del NO sobre las células adenohipofisarias.

64. Efecto del Interferon alfa-2b (IFN) en la iniciación-promoción de hepatocarcinogenesis en la rata. M Lujan Alvarez, Juan Pablo Cerliani, Juan Monti, Cristina Carnovale, Cristián Favre, Gerardo Pisani, Cristina Lugano, M Cristina Carrillo.

Instituto de Fisiología Experimental CONICET, Morfología, Facultad de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR, Rosario. ifise1@citynet.net.ar

Se analizó el efecto de la administración de IFN sobre el desarrollo de focos preneoplásicos en ratas sometidas a un modelo experimental multietadío: iniciación con dietilnitrosamina (dosis: 150mg/kg PC) y promoción con 2-acetilaminofluoreno (dosis: 20 mg/kg PC). Ratas Wistar macho adultas se dividieron en 4 grupos: control (C, n=4); iniciadas y promovidas (IP, n=8); iniciadas, promovidas y tratadas con IFN (6,5.10⁵ U/kg PC) durante la iniciación solamente (IFN_i, n=4) o durante iniciación-promoción (IFN_{ip}, n=4). Se determinó la presencia de focos preneoplásicos por detección de rGSTP por inmunohistoquímica y cantidad de rGSTP y p53 por inmunoblotting. **Resultados:** Se observó una disminución de la superficie de los focos (IP= 4,74±0,80; IFN_i=2,61±0,95*; IFN_{ip}=2,09±0,56 mm²/cm² tej) y del número de focos (IP=317±85,7; IFN_i=157±28,9*; IFN_{ip}=86,4±8,78 focos/cm² tej). La cantidad de rGSTP mostró coincidencia con estos resultados. Para p53 se analizaron las densidades de bandas, que fueron expresadas en unidades arbitrarias: IP=130±42,4; IFN_i=253±63,6; IFN_{ip}=218±35,3. (*p<0,05 vs IP). **Conclusión:** El IFN tiene acciones en la iniciación y promoción, con disminución tanto del área como del número de focos preneoplásicos. Uno de sus posibles mecanismos de acción sería mediante el aumento de los niveles de p53.

65. Peroxidación lipídica en el proceso de regeneración hepática. Cristina Carnovale; María de Luján Álvarez; María Carrillo; Cristián Favre; Juan Monti; Gerardo Pisani; Cristina Lugano.

IFISE-CONICET, Morfología, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR. Rosario. e-mail: ifise1@citynet.net.ar

Objetivo: Analizar la influencia de la lipoperoxidación (LPO) en el proceso de regeneración hepática. **Métodos:** Ratas Wistar machos adultas fueron divididas en 2 grupos: Sham (cirugía simulada) (S) y hepatectomizado (HP 65%). Las ratas fueron sacrificadas a las: 5 y 24 horas luego de la cirugía. Animales (n=4 de cada grupo) recibieron vitamina E 100mg/Kg PC s.c. (dosis 1, E₁), otros (n=4 de cada grupo) vitamina E 600mg/Kg PC (dosis 2, E₂) 24 h antes y en el momento de la cirugía. **Resultados:** El máximo aumento en LPO determinada como nmol de malondialdehído /100mg proteína microsomal, se observó a las 5 h después de la hepatectomía (S-5h: 60±6; HP-5h: 112±7*). El tratamiento con E₁ disminuyó este aumento (S-5h E₁: 64±9, HP-5h E₁: 80±7*) y con E₂ no existió aumento significativo (*p<0.05 vs S). El índice de regeneración estimado por incorporación de [³H]-timidina al DNA (dpm/mg DNA) mostró los siguientes aumentos: HP-24h: 41050±3100; HP-24h E₁: 64903±6200*; HP-24h E₂: 99173±7241*. Estimado por la técnica inmunohistoquímica de PCNA, el índice proliferativo (PI) mostró aumentos (HP-24h: 26 ± 3; HP-24h E₁: 39,7±1,0*; HP-24h E₂: 40,2±1,2*. (*p<0.05 vs HP-24h.). **Conclusión:** La disminución en la producción de LPO durante las primeras horas de la regeneración hepática favorece el proceso de regeneración.

66. El medio condicionado de pulmón, órgano blanco de la metástasis, inhibe la apoptosis e induce la proliferación de distintas células tumorales epiteliales. Alejandro Adam, Lydia Puricelli, Elisa Bal de Kier Joffé.

Area Investigación. Instituto de Oncología «A. H. Roffo». Universidad de Buenos Aires. aleadam@fmed.uba.ar

El destino de la célula metastásica depende del entorno en el cual se desarrolla. Antes demostramos que el medio condicionado de pulmón (LCM) induce un aumento, similar al SFB, en la proliferación e inhibe la apoptosis inducida por Doxorubicina (Dox) de las células LMM3. En este trabajo se analizó el efecto del LCM sobre la apoptosis inducida por Cisplatino (Cis) y Paclitaxel (Pax), evaluándose la viabilidad por el método de MTS. Se observó que el LCM protegió a las células de la citotoxicidad inducida por Cis (IC₅₀ tratadas=95 vs control=55 uM), mientras que no modificó la apoptosis inducida por Pax (IC₅₀=100 uM). También se estudió el efecto del LCM sobre la proliferación de células, normales y tumorales, de variada estirpe, mediante curvas dosis-respuesta (0,1-50% v/v). El LCM (10%) estimuló la proliferación del adenocarcinoma mamario altamente metastásico MM3, pero no la del tumor M3, de baja capacidad metastásica. LCM indujo el crecimiento del carcinoma de pulmón P07 y de su línea derivada LP07. La línea celular fibroblástica NIH3T3 no respondió al tratamiento con LCM mientras que la línea epitelial normal mamaria NMuMG fue estimulada, aunque no alcanzó los valores obtenidos con SFB. En conclusión, el LCM indujo preferentemente la proliferación de las células tumorales de origen epitelial. Asimismo, LCM promovió la sobrevida frente a drogas que inducen daño al DNA (Dox, Cis), pero no inhibió la apoptosis inducida por Pax, droga que daña la estructura del citoesqueleto.

67. La proteína de matriz del Virus de la Estomatitis Vesicular induce apoptosis en cultivos celulares.

Marina Vacotto, Patricia Gadaleta, Ximena Perfetti, Félix Coulombié.

Laboratorio de Virología. Dto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. (mvacotto@yahoo.com)

VSV induce apoptosis en células de mamíferos. A fin de investigar el componente viral involucrado se estudió si la proteína M es capaz de provocar apoptosis cuando se expresa en células COS-7 utilizando un vector que contiene el gen de dicha proteína (pKM*). Este vector fue cotransfectado con el plásmido pRSV que expresa el gen de la beta-galactosidasa, a fin de correlacionar la muerte celular y el número de células beta-gal* con la presencia de células con morfología apoptótica. Se observó una significativa reducción del número de células beta-gal* junto con un aumento del 50 % en el número de células que pierden adherencia al sustrato, en comparación con aquellas cotransfectadas con plásmido sin inserto (pKM*) y pRSV. Las monocapas cotransfectadas con pKM* y pRSV muestran por contraste de fase un considerable número de células con morfología apoptótica, tanto beta-gal* como beta-gal-. En las monocapas transfectadas con pKM* o pKM- y teñidas con bisbenzimidazolona solamente se observó por fluorescencia células con morfología nuclear apoptótica en las transfectadas con pKM*. La expresión del gen de la proteína M se verificó por inmunofluorescencia indirecta utilizando un suero policlonal contra VSV. Los resultados demuestran que la proteína M de VSV induce apoptosis en ausencia de cualquier otro componente viral.

68. Regulación de Bcl-X_s por glucocorticoides. Luciana Rocha Viegas, Carlos Lantos, Lino Barañán, Miguel Beato, Adalí Pecci.

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires;

Instituto de Biología y Medicina Experimental; Programa de Regulación Hormonal y Metabólica-Conicet; Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps Universität, Marburg, Alemania. Fax: 4576-3342

Bcl-X forma parte de una familia de proteínas involucradas en el control de la apoptosis celular. Se han descrito al momento cinco isoformas, producto de splicing alternativo de un único gen. Resultados anteriores del laboratorio demostraron que el gen de ratón posee al menos cinco promotores (P1 a P5) responsables de la expresión de productos de splicing específicos en distintos tejidos y que los glucocorticoides provocan un aumento en los niveles de la isoforma proapoptótica Bcl-X_s en timo. A fin de analizar cual de las regiones promotoras es regulada, se inyectaron ratones con Dexametasona (DEX) (500mg/100g peso corporal), se extrajeron los timos y se analizaron mediante RT-PCR los niveles de mRNA. Los resultados demostraron que la presencia del glucocorticoide no afecta la actividad de P1 ni P2, pero provoca un aumento en la relación Bcl-X_s/Bcl-X_L por activación de P3 (DEX/Control= 1.73). Transfecciones transientes con vectores de expresión que contienen el gen reportero luciferasa bajo control de P1, P2 y P3 respectivamente, confirmaron que el tratamiento con DEX induce 2.09 ± 0.05 veces la actividad de P3 respecto del control. Estos resultados sugieren que los glucocorticoides aumentarían los niveles de la isoforma Bcl-X_s como consecuencia de la activación de P3 en timo.

69. Efecto de la melatonina en la apoptosis de timocitos inducida por glucocorticoides Luciana Rocha Viegas[#], Ruth E. Rosenstein* y Adali Pecci[#].

*#Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y *Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Fax: 4576-3342*

Múltiples pruebas experimentales demuestran que la hormona melatonina, participa en diferentes procesos celulares, neuroendócrinos y fisiológicos. Evidencias recientes han sugerido un rol adicional para el metoxiindol como un agente antioxidante y antiapoptótico. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la melatonina en la apoptosis de timocitos inducida por glucocorticoides. Los resultados obtenidos indican que la melatonina, en concentraciones 10⁻⁶M y 10⁻⁸M, disminuyó significativamente la fragmentación del ADN inducida por Dexametasona 10⁻⁸M (%fragmentación: DEX=37.2±8.2; DEX+Mel=21.05±2.5 y 18.8±2.7 para 10⁻⁸M y 10⁻⁶M, respectivamente p ≤ 0.001) aunque careció de efecto *per se*. Estos resultados se confirmaron por citometría de flujo de núcleos aislados obtenidos de timocitos incubados con DEX y melatonina. A fin de evaluar el mecanismo de acción del metoxiindol, se analizó su acción sobre la expresión de miembros de la familia de bcl-2. Los resultados obtenidos por western-blots indican que la melatonina no afectó los niveles de Bcl-2, Bcl-X_L o Bcl-X_s. Sin embargo, se observó una disminución en los niveles de BAX. En suma estos resultados avalan el rol antiapoptótico de la melatonina y sugieren a BAX como un posible blanco de la acción del metoxiindol.

70. La activación de NF-kB no es señal suficiente para la protección de apoptosis por TNF-α. Lorena Franco, Omar Coso, Mónica Costas.

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. lfranco@bg.fcen.uba.ar

En la mayoría de los tipos celulares, la inducción de apoptosis por TNF-α requiere de una sensibilización de la célula blanco mediante el uso de antibióticos inhibidores de la transcripción o traducción. Con el objeto de determinar los mecanismos involucrados en la acción apoptótica mediada por TNF-α, se estudió: a) las quinasas involucradas en la cascada apoptótica;

b) el rol de NF-kB en este mecanismo; c) el efecto del estrés producido por NaCl y su posible rol sensibilizador a la acción de TNF-α. Células Hela preincubadas con 100 mM de NaCl y TNF-α (0.1-50 ng/ml) mostraron una respuesta apoptótica, dosis de TNF-α-dependiente respecto de las tratadas sólo con TNF-α (naturalmente insensibles al mismo). Esta dosis de NaCl estimuló la actividad de p-38 quinasa. El rol de NF-kB en esta cascada se determinó midiendo su actividad transcripcional en células Hela. Se observó que el TNF-α aumentó la actividad kB-Luc, mientras que la dexametasona la inhibió (50 + 10 %) sin observarse efectos sobre la supervivencia en ambas condiciones. Estos resultados sugieren que la sensibilización a la muerte por TNF-α, no implica sólo el bloqueo de la síntesis de novo de proteínas, sino que además, la activación de quinasas que responden a estrés.

71. Expresión de isoformas atípicas de PKC y de óxido nítrico sintasa en linfocitos T tumorales. Su relación con el estado hiperproliferativo celular. Gabriela Gorelik, Ana Genaro, Miriam Wald, Graciela Cremaschi.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos - CONICET. Facultad de Farmacia y Bioquímica y Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires. e-mail: ggorelik@cefybo.edu.ar

Previamente describimos una elevada expresión de isoformas atípicas de la proteína quinasa C (PKC), en linfocitos T (LT) tumorales (BW5147 -BW-), pero no en LT normales (LTn) o estimulados antigénicamente. En este trabajo se estudió el perfil de isoformas de PKC por western blot (determinando las unidades relativas -UR- al valor pixel total de LTn) y binding a ésteres de forbol (intensidad relativa de fluorescencia -IR-) en células BW y en LTn estimulados mitogénicamente (LTe). El perfil se relacionó con actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) (determinada por formación de ¹⁴C-Citrulina) y con actividad proliferativa. En BW se expresó la isoforma zeta (Z) (UR = 5.0; B máx: 515±42 IR) y escasamente la beta (B) (UR = 0.2; B máx: 62±5 IR). En LTe se observó una expresión inversa de Z?UR = 0.7; B máx: 21±3 IR) y B (UR = 2.9; B máx: 740±63 IR). Esto coincidió con una aumentada producción de NO (pmol/10⁷cel: BW =104.2±6.8 vs. LTe = 2.8±0.4, p<0.01), bloqueada por GF109203X y por L-NAME. La permeabilización de BW e incorporación del Ac monoclonal anti-PKCZ? fue capaz de inhibir la proliferación celular (BW: 14830±1114 dpm; anti-Z: 7330±620 dpm), y también la actividad de NOS (47±5% de inhibición), no así en LTe. Concluimos que en LT tumorales el perfil diferencial de isoformas de PKC, relacionado con una hiperactividad de NOS, podría protegerlos de su delección natural y contribuiría a su carácter hiperproliferativo.

72. Análisis digital de imágenes de la reducción del MTT y su implicancia para la evaluación de la proliferación celular. Beatriz Molinari, Débora Tasat, Mónica Palmieri, Silvia O'Connor, Rómulo Cabrini.

Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica. Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad de General San Martín. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. beamolin@cnea.gov.ar

El MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) se utiliza para cuantificar la proliferación celular. El producto final de esta reacción redox es la formación estequiométrica intracelular de formazana insoluble cuya evaluación cuantitativa por célula se realiza por análisis de imágenes digital. Se utilizaron cultivos de macrófagos peritoneales y alveolares de ratones SENCAR y células V79. Se obtuvieron valores de TOD (densidad óptica total) que son función del volumen celular encontrándose una correlación significativa entre TOD y volumen celular (R=0,87). La actividad específica (TOD/Area) de esta reacción es independiente del volumen

celular y sus valores son $7 \pm 1,2$ para fagocitos y de $9 \pm 2,1$ para V79 (45 min de MTT). El producto de esta reacción es excitado en forma de cristales de formazana. La cinética de formación de estos cristales depende de la estirpe celular. A los 45 min de incubación 70% de los macrófagos presentan sólo fagosomas y 30% cristales excitados. Este proceso es dinámico y al cabo de 4 horas de incubación los valores se revierten. Para células de la línea V79 este proceso sería modulado por el ciclo celular. Se deben considerar las variaciones en el volumen celular que los métodos convencionales de espectrofotometría no consideran, explicando así discrepancias sobre el test de MTT de evaluación de la proliferación celular.

73. Inhibición del crecimiento tumoral mediante la modulación *in vivo* de los niveles de peróxido de hidrógeno. Lucía Policastro¹, Beatriz Molinari¹, Hebe Durán^{1,2}.

¹Comisión Nacional de Energía Atómica, Departamento de Radiobiología y ²Universidad Nacional de General San Martín, Escuela de Ciencia y Tecnología.
e-mail: policast@cnea.gov.ar

Las especies reactivas del oxígeno participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos. En nuestro laboratorio hemos demostrado la participación del H_2O_2 en la modulación de la proliferación *in vitro*. El objetivo de este trabajo es evaluar la posible inhibición del crecimiento tumoral mediante la disminución de los niveles endógenos de H_2O_2 en tumores experimentales. Se indujeron tumores (I) mediante la inoculación subcutánea de células tumorales (CH72-T4) en ratones nude, o (II) mediante un protocolo de carcinogénesis química en ratones SENCAR. En ambos modelos, los animales se trataron mediante la inyección subcutánea de catalasa (1 mg/g) tres veces por semana (Cat). Se realizaron controles: sin tratamiento (C) y tratados con catalasa inactivada por calor (CI). Se demostró una significativa inhibición del crecimiento tumoral. Los resultados se expresaron como volumen tumoral al día 15 en I y al día 30 en II /volumen tumoral al día 1: (I) C: 10.1 ± 1.8 y CI: 10.4 ± 3.2 y Cat: 2.9 ± 0.6 y (II) C: 7.3 ± 2.6 y CI: 8.3 ± 2.8 Cat: 0.76 ± 0.3 . En II el número de tumores aumentó 63% en C, 68% en CI mientras que en Cat no aparecieron nuevos tumores y hubo una regresión del 32%. Estos resultados abren la posibilidad de evaluar la utilización de compuestos capaces de disminuir los niveles intracelulares de H_2O_2 como terapias antioxidantes.

GENÉTICA I

74. Detección de anomalías cromosómicas no recurrentes en linfomas no-Hodgkin (LNH) B difusos a células grandes. Roxana Cerretini¹, Marina Narbaitz², Irma Slavutsky¹.

Departamentos de Genética¹ y Anatomía Patológica², Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. e-mail: lacuteci@intramed.net.ar

El 70-90% de los LNH presentan cariotipos complejos con múltiples anomalías cromosómicas, siendo de interés identificar nuevas aberraciones a fin de definir su posible rol en el desarrollo de estas entidades. En este trabajo se analizaron los rearrreglos estructurales y los puntos de ruptura detectados en 22 pacientes con LNH B difusos a células grandes (clasificación REAL). Se efectuó cultivo de biopsia ganglionar y/o médula ósea (24-48hs) a 37°C, en medio F-10 suplementado con 15% de SFB. La identificación cromosómica se efectuó con bandeos G e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con sondas del total del cromosoma. Se detectaron 6 translocaciones, a nuestro conocimiento, no descritas previamente en la literatura, 2 de ellas no balanceadas y 1 compleja: t(2;21) (p11;q22), t(8;18) (q24.1;p11.3.2), t(12;16) (q13;q24), der(9)t(8;9) (q22;p14), der(16) t(12;16) (q13;p13) y t(4;8;11;19) (q34;q12;q24;q13.4), 14 deleciones que afectaron principal-

mente a los cromosomas 5, 6, 7 y 17 y 1 inserción del cromosoma 1: ins(1) (q11;p22-p36.3). Cinco casos (23%) presentaron además la t(14;18) (q32;q21). Se encontraron 39 puntos de ruptura, observándose recurrencia de 7q32, 8q24 y 12q13, puntos que corresponden a la ubicación de sitios frágiles y de genes que participan en el desarrollo neoplásico. Estos hallazgos indican la importancia de efectuar este tipo de estudios a fin de revelar nuevos cambios genéticos que podrían participar en el proceso de transformación maligna de las células linfoides.

75. Nuevo polimorfismo en el gen del factor VIII humano: Su utilidad para estudios de ligamiento en hemofilia A en población Argentina y Británica. Carlos De Brasi¹, Derrick Bowen², Marta Palumbo¹, Ariela Fundia¹, Peter Collins², Irene Larripa¹.

¹Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina (lacuteci@intramed.net.ar), Argentina. ²Haematology Department, University of Wales College of Medicine, UK.

La hemofilia es una enfermedad hemorrágica, hereditaria, ligada al sexo que afecta a 1 de 5000 varones en todas las poblaciones humanas. La hemofilia A (HA) se caracteriza por el déficit del FVIII de coagulación. El diagnóstico prenatal y de portadoras es generalmente basado en el uso de polimorfismos de DNA. Este reporte describe la localización y caracterización de un nuevo marcador en el intrón 22 del gen del FVIII. Es un polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de la enzima *MspI*, que puede ser estudiado por PCR anidada/digestión y cuya detección puede acoplarse a la del RFLP *XbaI*. Las frecuencias alélicas y el desequilibrio de ligamiento (*LD*) del nuevo RFLP *MspI* con otros como el *XbaI* y *BclI* fueron determinados en 142 cromosomas X de la población Argentina (57) y Británica (85). Su heterocigocidad resultó 49 y 46% respectivamente y su *LD* con los otros RFLPs, no completo en ambas poblaciones. Estas características demuestran que es un marcador muy útil para ser incorporado a la rutina de diagnóstico molecular en HA.

76. Novel aplicación del vector polietilenimina (PEI) en la preservación hipotérmica de hepatocitos. María Mediavilla, Adriana Krapp, Néstor Carrillo, Joaquín Rodríguez y Edgardo Guibert.

Biología Molecular. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (aaba@tower.net.ar)

Se propone aplicar el vector NO-viral ADN/PEI en la transfección de células en frío, en condiciones de preservación para trasplante hepatocelular, en solución de la Universidad de Wisconsin (UW). Se marcaron hepatocitos aislados de ratas Wistar macho adultas con éster diacetato de 5(6)-carboxi succinimidil fluoresceína (20 uM en MEM, 37°C, 15 min.) y se incubaron 48 hs. con un complejo plásmido/PEI (1ug ADN/10⁶ cél.) en suspensión en UW (3.10⁶ cél./ml) a 0°C y en anoxia. El plásmido codifica para el gen de Ferredoxina NADP⁺ oxidoreductasa de arveja (FNRA) bajo control del promotor del citomegalovirus. Luego, las células fueron inyectadas en bazo (1,5-4.10⁷ cél., 200ul) de ratas singeneicas, sacrificadas 24, 48, 72 hs. y 21 días postrasplante tomándose biopsias de bazo e hígado. Sobre los cortes histológicos se inmunodetectó FNRA. Mediante examen en microscopio de fluorescencia y óptico se observó colocalización de hepatocitos fluorescentes (trasplantados) y positivos para tinción inmunológica para los tiempos postrasplante 24, 48 y 72 hs., pero no a los 21 días ni en controles negativos realizados. Además los animales no mostraron signos de intolerancia hasta su sacrificio (máximo 21 días). Se concluye entonces que los hepatocitos trasplantados fueron efectivamente transfectados durante la preservación hipotérmica y que el sistema ADN/PEI no sería hepatotóxico.

- 77. Dos mutaciones nuevas en Porfirias Agudas.** Adriana De Siervi, Victoria Parera, Laura Varela, Alcira Battle & María V. Rossetti.

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. CONICET. (rossetti@qb.fcen.uba.ar)

Las porfirias son desórdenes genéticos del metabolismo del hemo. Se clasifican clínicamente en agudas y no-agudas. De las agudas, la Porfiria Aguda Intermitente (PAI) y en menor proporción la Porfiria Variegada (PV), son las más frecuentes en nuestra población. El defecto primario es una falla en el gen que codifica para la Porfobilinógeno deaminasa y la Protogen oxidasa, respectivamente. Los estudios bioquímicos no brindan siempre un diagnóstico certero el que es de vital importancia en los familiares asintomáticos. El estudio genético es así fundamental en las familias afectadas. Se extrae el ADN a partir de sangre periférica, los genes se amplificaron por PCR y los productos purificados se secuenciaron cíclicamente. En este trabajo se describe la detección y caracterización de 2 mutaciones de splicing, una en PAI y otra en PV. **Caso PAI:** mutación puntual (g@c) en la primera base del intrón 7 que produce la pérdida del exón 7. **Caso PV:** mutación puntual (G@A) en la última base del exón 7 que, a pesar de no producir cambio de aminoácido (Lys@Lys), conduce a la pérdida del exón 7. Ambos resultados se confirmaron por RT-PCR. Estos estudios corroboran una vez más la heterogeneidad molecular de las porfirias.

- 78. Frecuencia de los alelos del gen codificador de matrilina-1 (CRTM) y su relación con osteoartritis.** Ingrid Strusberg, Adela Sembaj, Sandra Tabares, y José Moreno Barral.

Centro Piloto de Detección de Errores Metabólicos. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Fax: 0351-4251996

La osteoartritis (OA) es una enfermedad multifactorial con un importante componente genético. La matrilina-1 (CRTM) se halla en la matriz extracelular del cartilago de crecimiento durante la formación endocondral del hueso. Variaciones genotípicas del gen que codifica para CRTM podrían estar relacionadas con el desarrollo de OA. **Objetivo:** comparar la frecuencia de los alelos del gen CRTM en casos no emparentados de OA. **Pacientes y métodos:** Se estudiaron 63 pacientes con diagnóstico de OA periférica (rodilla y manos) y axial (columna cervical, lumbar y cadera) según criterios de clasificación del American College of Rheumatology. Se amplificó por PCR una secuencia no trasducida del gen CRTM. Se identificaron los alelos mediante geles de poliacrilamida en 33 casos de OA periférica, 12 de OA axial y 18 de ambos tipos. **Resultados:** Se encontraron 5 genotipos y 3 alelos: A1, de 107 pares de bases (pb), A2, de 105 pb y A3, de 103 pb. El genotipo más frecuente fue el homocigota 107/107 (49%). Los distintos tipos de OA no se asociaron significativamente con ninguno de los alelos ni genotipos hallados. **Conclusión:** No se observó correlación entre la frecuencia de los alelos ni genotipos del gen CRTM y la presencia de OA axial y/o periférica. Se considera necesario ampliar la muestra para corroborar estos resultados.

- 79. Retinoblastoma: estudio molecular y poblacional del gen RB1.** Dalamón Viviana, Surace Ezequiel, Giliberto Florencia, Ferreiro Verónica y Szijan Irene.

Cátedra de Genética y Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad de Buenos Aires. vdalam@huemul.ffyb.uba.ar

El Retinoblastoma, tumor maligno de la retina, afecta a niños hasta los 5 años de edad (1:20000). Se origina por mutaciones en el gen RB1(13q14). Nuestro estudio se basa en identificar al cromosoma afectado y a las mutaciones responsables

de la pérdida de funcionalidad de la proteína. Se realiza mediante: 1-estudio de segregación de alelos polimórficos en DNA de leucocitos y tumor, 2-identificación de mutaciones pequeñas por PCR-Heteroduplex y secuenciación directa. Se analizaron 4 polimorfismos intragénicos (intrones 1, 4, 17 y 20) en 143 muestras de DNA de leucocitos y 25 muestras de DNA tumoral, correspondientes a 47 familias con individuos afectados. Se determinó el alelo mutado y su origen parental en 16 familias (34%). Se detectó pérdida de heterocigosidad en 11 muestras tumorales (44%). Todas las familias analizadas resultaron informativas para algún polimorfismo. Se realizó PCR-Heteroduplex-secuenciación para los exones 18 a 25 en 18 familias (144 muestras). Se observaron patrones normales para todos los exones analizados. El análisis de secuencia demostró ausencia de una mutación, previamente identificada en un afectado con RB bilateral, en dos hermanos del paciente, por lo que se los excluyó de ser portadores. La segregación de poli-morfismos y la secuenciación permitieron determinar el estado de portador en las familias y excluir a individuos de riesgo.

- 80. Detección Molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en tejidos con inflamación granulomatosa y tinción para bacilos-acido-alcohol-resistente (BAAR) negativo.** Valeria Denninghoff, Javier Pecollo, Alejandra Avagnina, Boris Elsner.

Servicio de Anatomía Patológica. (CEMIC). Fax: 4805-9438.

En tejidos sometidos a examen histológico, el diagnóstico de tuberculosis es sugerido por la inflamación granulomatosa. La presencia de BAAR frecuentemente no puede ser confirmado mediante la tinción de Ziehl Neelsen (ZN) por ser una técnica poco sensible. La mayor sensibilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es útil para un diagnóstico de tuberculosis. Se estudiaron 10 biopsias, con diagnóstico anatómo-patológico de inflamación granulomatosa y ZN negativo. Mediante dos PCR se analizó la presencia del gen 65 kDa para *Mycobacterias sp.* y la presencia del gen IS6110 para *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Resultados:** Se observó que 4/10 de las biopsias analizadas dieron resultado positivo, tanto para *Mycobacterias* como para *Mycobacterium tuberculosis* complex. Las restantes muestras dieron negativas para ambas PCR. Por otro lado los resultados para todos los controles utilizados fueron los esperados. Todas las muestras amplificaron el gen de la beta-globina, como control de amplificación. **Conclusiones:** La determinación mediante PCR de *Mycobacterias sp.* y *Mycobacterium tuberculosis* complex en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina con diagnóstico anatómo-patológico de inflamación granulomatosa y ZN negativo, aumenta la confirmación del diagnóstico para tuberculosis en un 40% en nuestra serie.

- 81. Análisis genético de dos líneas de ratones que difieren en su masa ósea máxima.** Ariel Naidich, María Teresa Font, Lucila Hinrichsen.

Instituto de Genética Experimental. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. lhinrich@fmedic.unr.edu.ar

La masa ósea máxima (MOM) es uno de los indicadores más importantes de la fragilidad ósea que determina la osteoporosis. Los ratones proveen un modelo adecuado de los cambios que llevan a la osteoporosis, por ello el análisis genético de MOM en líneas que difieren en dicho carácter permitirá una mejor comprensión de su regulación genética. Se utilizaron machos y hembras de las líneas CBI+ (+) y CBI/L (L), distintas en peso corporal y longitud de esqueleto, y de las cruces recíprocas F₁. Los animales se sacrificaron a los 49 y 120 días de edad (n=8 por grupo). Se extirpó y disecó el fémur derecho y se midió su longitud (LF, mm); se deshidrató hasta peso constante (PF, mg) y se disolvió en una solución

clorhídrica para determinar Ca^{2+} (CaF, mg). Los datos se expresaron en valores absolutos y relativos (r); las diferencias entre grupos se analizaron con un ANOVA. Las F_1 se promediaron, ya que no se observaron efectos maternos. En ambas edades, machos y hembras mostraron valores similares. Los genotipos difirieron en PF ($p < 0.001$) (120 días, L: 54.1 ± 1.7 , +: 82.6 ± 1.4 , F_1 : 72.4 ± 1.2) pero no en LF ($p > 0.05$) ni en CaFr ($p > 0.05$), cuando se expresó por unidad de peso. El CaFr por unidad de longitud femoral fue distinto ($p < 0.01$) (120 días, L: 0.74 ± 0.03 , +: 1.11 ± 0.03 , F_1 : 0.91 ± 0.02). Los resultados sugieren una determinación genética aditiva de los caracteres que contribuyen a definir la arquitectura femoral.

NEFROLOGIA I

82. Expresión de fibronectina (FN) en túbulos proximales (TP) en riñón de rata después de 40 minutos de isquemia unilateral sin reperfusión. Guillermo Petrini, Elena Ochoa*, Esteban Serra**, Adriana Torres, Mónica Elías.

*Farmacología. Fac. de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas – Universidad Nacional de Rosario. Conicet. *IFISE; **IBR.e-mail@agatha.unr.edu.ar*

Se analiza FN-mRNA en TP aislados por técnicas de RT-PCR, para explicar el aumento de la cantidad de FN descripto durante la isquemia. Se obtuvieron TP de riñones controles (C) y de riñones con isquemia (I). Los TP se obtuvieron por digestión de la corteza renal con colagenasa y separación en gradiente de Percoll. La preparación se caracterizó por la liberación de LDH al medio y el desarrollo de la isquemia por las medidas de Ca^{2+} y ATP intracelular y la actividad de fosfatasa alcalina (FA). Los resultados fueron: LDH%: [C (n=9), 10.1 ± 0.9 ; I (n=8), 21.2 ± 2.4 *]; [Ca^{2+}] (nmol/ mg prot): [C (n=5), 0.25 ± 0.07 ; I (n=4), 0.61 ± 0.09 *]; ATP (nmol/mg prot): [C (n=10), 5.40 ± 0.60 ; I (n=9), 2.96 ± 0.59 *]; FA (mU/mg prot): [C (n=4), 665 ± 42 ; I (n=4), 248 ± 38 *]. La cantidad de FN medida por ELISA fue: C (n=5), 6.5 ± 1.8 ; I (n=5), 28.9 ± 4.5 * ng/ mg prot (*: $p < 0.05$). La transcripción del gen de FN y su magnitud durante isquemia se realizó usando oligonucleótidos de actina como control interno e indicó un aumento promedio de la expresión del gen de FN del 100% en I comparado con C. Se analizó la posibilidad de que distintas formas de FN producidas como resultado de la maduración (splicing) alternativa del mensajero estuvieran involucradas en el aumento medido. El resultado fue un incremento homogéneo en las 3 variantes de mRNA sugiriendo que no se modifica el patrón de "splicing".

83. Efecto de paracetamol (APAP) sobre la actividad de Na^+ , K^+ ATPasa (NaKA) en células aisladas de corteza renal. Laura Trumper, Gabriela Coux, Liliana Monasterolo, Mónica Elías.

Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario e-mail: ltrumper@agatha.unr.edu.ar

En estudios previos mostramos que una dosis nefrotóxica de APAP en ratas Wistar macho, provoca cambios en la actividad de NaKA en membranas basolaterales de corteza renal, y que metabolitos de APAP derivados del hígado son en parte responsable de sus efectos nefrotóxicos. En este trabajo se evaluaron los efectos de APAP sobre la NaKA en células corticales incubadas in vitro y aisladas de animales intoxicados. Se midió la actividad de NaKA ($\mu\text{mol Pi/mg prot.h}$) en los siguientes grupos: 1) células obtenidas a partir de corteza renal de animales sin tratamiento (C, n= 8), 2) Obtenidas luego de 1 hora de la administración de 1000 mg/kg de APAP (A1h, n=4), 3) ídem 2) luego de 16 horas (A16h, n=4), 4) Incubadas in vitro con APAP 1 mM durante 10 min (IV10, n=4), 5) ídem 4) durante 30min (IV30, n=4). Se comprobó la viabilidad por la

exclusión de azul tripan y liberación de lactato deshidrogenasa. En C no varió la actividad de NaKA en el tiempo. Luego de 16 hs de la administración de APAP hubo una disminución de la actividad de NaKA (C= 42.4 ± 0.8 , A16h= 34.6 ± 0.7 , $p < 0.01$). La incubación in vitro disminuyó la actividad de la enzima (C= 42.4 ± 0.8 , IV10= 36.5 ± 3.1 , IV30= 26.2 ± 3.1 , $p < 0.05$ vs.C). Los resultados in vitro indican que APAP afectaría la actividad de NaKA en células corticales aisladas en ausencia de la posible participación de metabolitos derivados del hígado.

84. Alteraciones en la retención de agua en ratas intoxicadas con aluminio. Stella Mahieu, Néstor Millén, Guillermo Petrini*, M. Mónica Elías.

*Fisiología Humana. Facultad de Bio-química y Ciencias Biológicas – UNL. *Farmacología- Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas – UNR.*

Las ratas tratadas en forma crónica con aluminio presentaron cambios en la excreción de agua y iones. El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de concentrar la orina y la respuesta a vasopresina (VP) en ratas tratadas con $\text{Al}(\text{OH})_3$ desde el destete y por cuatro meses (80mg/kg peso, ip 3 veces por semana (T) y ratas controles (C). Se usaron técnicas convencionales de clearance. T(n=7) y C(n=6) fueron infundidas con solución fisiológica e inulina a una velocidad de 4ml/h, administrándose 0.4 μg VP/rata iv al inicio de la infusión. En ratas T se observó un aumento significativo de la EF% de agua (C= 0.21 ± 0.001 ; T= 0.27 ± 0.0006); una menor osmolaridad urinaria mosm/kg (C: 1934 ± 137 ; T: 1409 ± 56); y una reducción en la EF%Na. No se observaron cambios en la concentración sérica de aldosterona pg/ml (C: 358 ± 61 ; T: 280 ± 43), pero si una desminución de AMPc nefrogénico pmol/min (C: 302 ± 42 ; T: 194 ± 8). No hubo diferencias en VFG ni en TC/VFG. Los resultados indicarían una disociación en la excreción de agua y sodio, una alteración en la respuesta a VP con disminución a la permeabilidad al agua vinculada a la disminución de la excreción de AMPc. A tal fin se estudió la expresión de canales AQP2 en homogenados de corteza y médula de riñones T y C. No se detectaron diferencias en la cantidad de proteína, lo que sugiere la necesidad del estudio de su inserción en membranas.

85. Deficiencia gestacional de colina y desarrollo renal. Cecilia Courrèges, María Luisa Díaz, y Alberto Monserrat.

Patología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y Medicina Nuclear, Hospital Británico. e-mail: amonserr@fmed.uba.ar

En diversas especies, alteraciones en el metabolismo de colina, metionina, B12 y/o ácido fólico pueden inducir anemia, cáncer, cirrosis e insuficiencia renal. El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de la deficiencia gestacional de colina sobre el desarrollo renal de las crías. Para ello, ratas Wistar preñadas se alimentaron durante toda la gestación con dietas sin (CD) o con 0.1% p/p de cloruro de colina (CS). Durante la lactancia, las madres fueron transferidas a dieta comercial al igual que las crías luego del destete. Estas se sacrificaron a los 28 días de edad, determinándose: número y diámetro de glomérulos, uremia, creatinemia, contenido de folato, B12 y homocisteína en suero. Los resultados obtenidos ($x \pm \text{DS}$) indican una disminución significativa del número de glomérulos (hembras CD (n=13): 8137 ± 6161 ; hembras CS (n=7): 55476 ± 18124 , $p < 0.0001$) y no de su diámetro; un aumento significativo de la homocisteína sérica (hembras CD (n=10): 5.985 ± 0.953 ; hembras CS (n=7): 4.257 ± 1.324 , $p < 0.02$), en ausencia de diferencias en el resto de los parámetros estudiados. En los machos se obtuvieron similares resultados. Dado que un menor número de glomérulos aumenta la predisposición al desarrollo de enfermedades renales crónicas, la deficiencia gestacional de colina podría actuar como un factor condicionante para dichas patologías.

86. Desnutrición proteica gestacional y progresión de la enfermedad renal. Cecilia Courrèges, Eugenia Macagno, Néstor Lago, María Luisa Díaz y Alberto Monserrat.

Patología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y Medicina Nuclear, Hospital Británico (e-mail: amonserr@fmed.uba.ar)

Este trabajo fue realizado para estudiar la influencia de la malnutrición proteica gestacional en la progresión de la enfermedad renal. Ratas Wistar preñadas se alimentaron durante toda la gestación con dietas isocalóricas conteniendo 8% o 20% de caseína. Durante el período de lactancia, las madres fueron transferidas a dieta comercial al igual que las crías luego del destete. A distintos tiempos se midió proteinuria y tensión arterial. A los 4 meses de edad los animales fueron sacrificados, determinándose número de glomérulos y diámetro de los mismos, uremia, creatinemia, contenido de folato, B12 y homocisteína en suero. Los resultados obtenidos indican una disminución significativa ($p < 0,05$) del número de glomérulos (8% ($n=13$): 38520 ± 8148 ; 20% ($n=18$): 48073 ± 9415) y un aumento ($p < 0,05$) de la homocisteína (8%: $5,96 \pm 1,03$ $\mu\text{moles/L}$ vs. 20%: $4,9 \pm 1,06$ $\mu\text{moles/L}$), B12 (8%: $836,93 \pm 125,77$ $\mu\text{g/ml}$ vs. 20%: $549,19 \pm 120,33$ $\mu\text{g/ml}$) y folato (8%: $27,013 \pm 5,05$ mg/dl vs. 20%: $18,21 \pm 3,10$ mg/dl). No se observaron diferencias entre los distintos grupos en el resto de las determinaciones realizadas. Similares resultados se obtuvieron en los machos. Los estudios realizados confirman que la malnutrición proteica gestacional ocasiona disminución del número de glomérulos y señalan un aumento de homocisteína sérica que podría favorecer el desarrollo de daño vascular.

87. Función renal y parámetros bioquímicos en túbulo contorneado proximal (TCP) de rata con isquemia y reperusión. Guillermo Petrini, Elena Ochoa*, Adriana Torres, Mónica Elías.

*Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas-Universidad Nacional de Rosario. CONICET. *IFISE. melias@agatha.unr.edu.ar*

Se estudia el efecto de la reperusión después de isquemia renal de 40 min en rata sobre las alteraciones bioquímicas ya descritas en TCP aislados de riñones isquémicos y su posible relación con la función renal medida a las 24 h. Luego de isquemia renal de 40 min. (I), las ratas se dejaron en jaulas metabólicas por 24 h (Ire). Al final se extrajeron los riñones y muestras de sangre. Se usaron controles adecuados (C). Se obtuvieron TCP por digestión con colagenasa y separación por gradiente de Percoll. Los TCP estudiados fueron: C, CI (contralaterales) e Ire y los datos se compararon con I sin reperusión. Se midió el contenido de Ca, ATP y expresión de fibronectina. Los resultados indican: a) los TCP(Ire) mantienen la expresión elevada de FN y esto no se manifiesta en el CI; b) el ATP depletado se recupera y supera el valor control en ambos riñones [ATP nmol/mgprot]: C= $5,49 \pm 0,6$ (10); I = $2,96 \pm 1,78$ (9), Ire = $10,5 \pm 11^{**}$ (4), Clre = $10,6 \pm 0,4^{**}$ (4)]. El Ca se normaliza en Ire pero aumenta significativamente en el Clre. La función renal se encuentra deteriorada siendo marcados el aumento en la EFagua % [C= $2,7 \pm 0,9$; Ire= 10 ± 3] y la disminución de la U/P osm [C= $5,3 \pm 1,5$, Ire= $2,2 \pm 0,8$]. En el proceso de reperusión, si bien se normalizan los niveles de calcio y se mantiene un alto nivel de ATP, se conserva la sobreexpresión de fibronectina en el riñón que fue isquémico sin recuperación de la función renal.

COMUNICACIONES ORALES

ENDOCRINOLOGIA II

88. Regulación de la actividad de láctico deshidrogenasa (LDH) y de la incorporación de 2-

deoxiglucosa (2-DOG) por factores de crecimiento y citoquinas en células de Sertoli. Fernanda Riera, Silvina Meroni, Gabriela Gomez, Helena Schteingart, Eliana Pellizzari, Selva Cigorraga.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños "R. Gutiérrez". Buenos Aires. e-mail: _scigorraga@cedie.guti.gov.ar

La célula de Sertoli es regulada por FSH, testosterona y péptidos de producción local entre los que se encuentran factores de crecimiento y citoquinas. La producción de lactato por estas células es esencial para el normal desarrollo de la espermatogénesis. En el presente trabajo hemos analizado el efecto del estímulo crónico de los factores de crecimiento EGF (50ng/ml), betaFGF (10ng/ml), TGFbeta (1ng/ml) y las citoquinas IL1beta (50ng/ml), TNFalpha (20ng/ml), interferon gamma (INF 20ng/ml) sobre la producción de lactato, la actividad de LDH y la incorporación de un análogo no metabolizable de la glucosa, 2-DOG. Los resultados obtenidos se expresan como media \pm DS, $n=3$, $*p < 0,05$ vs basal. Lactato: basal $8,7 \pm 0,85$, EGF $12,4 \pm 0,2^*$, FGF $15,5 \pm 1,1^*$, TGF $8,8 \pm 0,6$, IL1 $19,0 \pm 1,5^*$, TNF $9,2 \pm 1,1$, IFN $8,6 \pm 0,9$ $\mu\text{g/ugDNA}$. Actividad de LDH: basal $36,6 \pm 2,1$, EGF $50,8 \pm 5,0^*$, FGF $52,7 \pm 3,2^*$, TGF $35,9 \pm 1,7$, IL1 $55,3 \pm 3,3^*$, TNF $35,0 \pm 1,8$, IFN $36,6 \pm 1,0$ mUI/ugDNA . Incorporación de 2-DOG: basal 1111 ± 87 , EGF $1503 \pm 123^*$, FGF $1588 \pm 112^*$, TGF 1194 ± 74 , IL1 $1785 \pm 127^*$, TNF 1341 ± 159 , IFN 1073 ± 64 dpm/ugDNA . Los resultados obtenidos sugieren que aquellos péptidos que estimulan la producción de lactato en células de Sertoli lo hacen aumentando la incorporación de glucosa a la célula y aumentando la actividad de LDH.

89. Las hormonas tiroideas regulan el consumo de oxígeno modulando la actividad de la óxido nítrico sintasa mitocondrial. M. Cecilia Carreras, Daniela Converso, Jorge Peralta, Angel Zaninovich y Juan J. Poderoso.

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. jpoderos@fmed.uba.ar

El hipotiroidismo se caracteriza por una disminución del consumo de oxígeno sistémico. Recientemente, hemos descripto la presencia de una óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt) en el hígado de rata y su posible rol en la regulación del metabolismo del oxígeno. *Objetivo:* estudiar la posible relación entre la disminución del consumo de oxígeno y la modulación de la expresión y/o actividad de la NOSmt. Ratas Wistar fueron divididas en 3 grupos: a) control (C), b) hipotiroideas (inyectadas un mes antes con ^{131}I) y c) hipotiroideas inyectadas s.c. con 2ug T4/ 100 g peso corporal durante 3-5 días consecutivos antes de ser sacrificadas ($n=8/\text{grupo}$). *Resultados:* El hipotiroidismo disminuyó el consumo de oxígeno sistémico (-37%, C: 25 ml $\text{O}_2/\text{min/kg}$, $p < 0,05$) y de las mitocondrias hepáticas purificadas en estado 4 (-16%) y en estado 3 (-25%, C: 120 $\text{natg O/min/mg prot}$, $p < 0,05$) sin modificar el control respiratorio ni la P/O. Este efecto fue incrementado en presencia del sustrato de la NOS (L-arginina: 0,3 mM). Concomitantemente, se observó un aumento en la expresión de la NOSmt (WB) y de su actividad (400%, C: 40 $\text{pmoles } ^3\text{H-L-citrulina/min/mg prot}$, $p < 0,05$). La T4 reestableció el consumo de oxígeno sistémico y mitocondrial y disminuyó el incremento en la actividad de la NOSmt en las ratas hipotiroideas. Los resultados sugieren que las hormonas tiroideas modulan la expresión y actividad de la NOSmt hepática y que el consumo de oxígeno *in vivo* podría depender de la concentración matricial de NO.

90. Expresión del mRNA para la p450 SCC en áreas hipotalámicas y límbicas de la rata macho: medición por RT-PCR semicuantitativa. Pablo Arias, Heike Luft*, Hubertus Jarry*

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina,

UBA, y Abteilung Endokrinologie, Frauenklinik, Universität Göttingen*

Objetivos: 1) desarrollar un método de RT-PCR para detectar el mRNA de la P450 SCC, paso inicial de la síntesis de esteroides, en muestras discretas de tejido del SNC, y 2) evaluar, mediante este método, su expresión en núcleos hipotalámicos y en regiones del s. límbico vecinas al hipotálamo anterior en la rata macho. **Metodología:** ratas Wistar macho (340-360 g) fueron decapitadas y el cerebro congelado sobre hielo seco. De cortes frontales de 600 μ m se obtuvieron "punches" de 0.8 mm Φ de: n. preóptico (PON), n. supraquiasmático (SCN), hipotálamo mediobasal (MBH), región septal (SEP), área amigdalina anterior (AAA) y n. stria terminalis (BNST). La expresión del mRNA para P450 SCC fue medida por medio de RT-PCR, empleando primers previamente descritos. Como control positivo empleamos distintas concentraciones de cDNA de ovario, obtenidas con anterioridad. **Resultados:** tras la amplificación (34 ciclos) de 300 ng de cDNA de las distintas regiones se demostró la presencia de una banda de aprox. 500 bp (correspondiente al producto teórico de 473 bp) en el MBH, pero no en el PON, el SCN o en las áreas límbicas estudiadas. La intensidad de la señal se correspondió aproximadamente con la de 15 ng de cDNA de ovario. **Conclusiones:** es posible, mediante RT-PCR, demostrar la presencia del mRNA para la P450 SCC en muestras de tejido nervioso de un volumen de apenas 1 μ l, como por ejemplo núcleos hipotalámicos aislados mediante la técnica del "needle punch". Con este método hemos podido demostrar una expresión diferencial del mRNA de esta enzima en distintos núcleos del hipotálamo y del s. límbico de la rata macho adulta: de las zonas estudiadas, únicamente detectamos su presencia en el MBH.

91. Expresión de los mRNA para LHRH, glutamato-decarboxilasa (GAD) y transportador de GABA (GAT-1) en el núcleo preóptico (PON) de la rata hembra: relación con los niveles de estradiol (E2) y con la pulsatilidad de LH. Pablo Arias, Sabine Leonhardt*, Damián Refojo, Hubertus Jarry*

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, y *Abteilung Endokrinologie, Frauenklinik, Universität Göttingen

Objetivos: 1) estudiar el efecto de la castración y el reemplazo con E2 sobre la expresión de los mRNA para LHRH, GAD y GAT-1 en el PON, y 2) evaluar posibles modificaciones en estos parámetros asociadas a la actividad del generador de pulsos de LH. **Metodología:** 75 ratas Wistar adultas (240-280 g) fueron ovariectomizadas (OVX) 15 días antes del experimento, recibiendo 15 de ellas benzoato de E2 (OVX-E2; 100 μ g/kg s.c.) 40 horas antes del mismo. En la mañana del experimento, a las 9.00 hs, se obtuvieron de las ratas OVX, a través de una cánula yugular, 8 muestras de sangre (una cada 5 min) con el fin de detectar pulsos de LH (RIA). Luego todos los animales fueron decapitados, recogiendo sangre para el dosaje de E2 (RIA), y se congeló el cerebro sobre hielo seco. Medimos, en "needle-punches" de los PON, la expresión de mRNA para LHRH, GAD65, GAD67 y GAT-1 por técnicas de RT-PCR semi-cuantitativa previamente descritas. **Resultados:** comparados con los animales OVX-E2, los animales OVX mostraron una clara disminución en la expresión del mRNA para LH, GAD65 y GAT-1 ($p < 0.05$, 0.02 y 0.02 respectivamente; t-test). No se encontraron diferencias al comparar aquellos animales OVX que mostraban niveles crecientes de LH durante los 35 min previos al sacrificio (rama ascendente del pulso de LH), con los que mostraban una disminución sostenida de estos niveles (rama descendente). **Conclusiones:** en el corto plazo, los cambios en la actividad del generador de pulsos de LH no se asocian a modificaciones de la expresión de mRNA para LHRH o para enzimas relacionadas con la actividad del sistema GABAérgico; en cambio, nuestros resultados indican que la disminución del tenor estrogénico ejerce un efecto negativo sobre dicha expresión.

92. Expresión del factor de transcripción XBP-1 en la línea osteoblástica MC3T3-E1 y su regulación genética por PTH. Andrés Zambelli, Elias Mongiardini, Miguel Reigosa, Ray Boot-Handford y Gillian Wallis.

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, La Plata. School of Biological Sciences, University of Manchester. (imbice@netverk.com.ar)

Mediante la técnica de hibridación sustractiva y a partir de una librería de cDNA obtenido de condrocitos de placa de crecimiento óseo fetal bovina, hemos aislado el gen del factor de transcripción XBP-1. Gran parte de la información básica actualmente disponible sobre la acción de PTH se obtuvo trabajando en líneas celulares osteoblásticas. El objetivo de este trabajo es investigar si el gen XBP-1 se expresa en la línea celular osteoblástica MC3T3-E1 y el efecto de PTH (1-34) exógeno sobre su transcripción. Se aisló RNA total de un cultivo de MC3T3-E1 y por hibridación por *northern blot* utilizando como sonda el clon XBP-1 aislado, comprobamos su expresión en la línea. Se trataron cultivos con PTH 10^{-7} M a tiempo 0 (control), 0.5, 2.5, 3.5 y 4.5 horas y se cuantificó la transcripción de XBP-1 utilizando la expresión de RNA 18S como valor de referencia. Observamos que luego de 2.5 h de tratamiento, PTH estimuló significativamente en alrededor del 90%, respecto del control, la transcripción de XBP-1 ($p < 0.05$; $n=3$). Los tratamientos a los tiempos restantes no mostraron diferencias significativas. En la línea MC3T3-E1, PTH actuaría como regulador transcripcional de XBP-1 en forma rápida y por corto tiempo, en coincidencia con el efecto que esta hormona tiene en estas células sobre c-Fos, perteneciente a la misma familia de factores de transcripción que XBP-1.

93. La apoptosis como mecanismo efector de la disfunción temprana en el trasplante de islotes de Langerhans. Mercedes Vieiro, Sung Ho Hyon, Alejandra Hidalgo y Pablo Argibay.

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental. Hospital Italiano de Buenos Aires. (mmvl@italba.edu.ar)

El trasplante de islotes pancreáticos puede iniciar en el huésped una respuesta inflamatoria mediada por monocitos, que al activarse, liberan citoquinas productoras de disfunción del injerto celular. Debido a que estas citoquinas son inductoras de apoptosis y que se ha observado un aumento de TNF- α luego del trasplante de islotes, son nuestros objetivos investigar: a) la presencia de apoptosis en los implantes, b) las variaciones asociadas de los niveles de TNF- α , c) el potencial correlato entre ambas variables. Utilizando el modelo de trasplante isogénico en ratones C57BL/6, se implantaron 300 islotes bajo la cápsula renal de receptores diabetizados con estreptozotocina ($n=21$). Se determinaron las glucemias diarias. Se calcularon los porcentajes de apoptosis por la técnica de TUNEL y de TNF- α intraperitoneal por ELISA, a distintos tiempos: 0 (control), 5, 8 y 14 días. Se observaron niveles bajos de apoptosis en los controles con un aumento significativo en los días subsiguientes (0,6%, 1,93% y 1,29% respectivamente, $p < 0,001$), coincidiendo con la curva de glucemias (234,5 \pm 49,8; 325,5 \pm 42,7 y 258,4 \pm 44,2 mg/dl promedio \pm SEM, respectivamente). Estos valores no se correlacionaron con los niveles de TNF- α en el líquido intraperitoneal. Concluimos que la apoptosis podría participar en la disfunción temprana de los islotes pancreáticos por un mecanismo TNF- α independiente.

94. Efecto perinatal del ácido gamma-aminobutírico. Jaime Moguilevsky, Silvia Carbone, Osvaldo Ponzio, Dora Rondina, Pablo Scacchi, Roxana Reynoso y Berta Szwarcfarb.

Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. jmoguile@mail.fmed.uba.ar

Hemos comprobado que durante la maduración sexual, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) estimula la secreción de

gonadotropinas en la etapa prepúberal y la inhibe en el período peripúberal y adulto. En este trabajo realizamos un estudio ontogénico del efecto del sistema gabaérgico sobre LH en ratas hembra prepúberes (n=7-8) de 6, 12, 15, y 30 días inyectadas con ácido aminoxiacético (AOA) (20 mg/kg i.p.). Se midió LH plasmático (ng/ml) por RIA (6 días: 22.5 ± 4.0 vs 11.2 ± 2.1; 12 días: 36.07 ± 2.7 vs 68.3 ± 1.7; 15 días: 24.4 ± 4.7 vs 195 ± 23.6; 30 días: 36.33 ± 4.4 vs 23.2 ± 1.8). En homogenato de hipotálamo anterior y medio basal (APOA-HMB) de los mismos grupos experimentales se determinó GABA (nmol/mg de proteína) por HPLC (6 días: 10 ± 0.7 vs 17 ± 2.6; 12 días: 19 ± 0.3 vs 192 ± 25; 15 días: 25 ± 0.5 vs 205 ± 15; 30 días: 10.8 ± 0.2 vs 21 ± 3.3). Estos resultados indican que: 1) en la etapa perinatal (6 días) y peripúberal (30 días) AOA inhibe significativamente (p<0.001) LH, mientras que en el período prepúberal (12-15 días) es estimulante (p<0.001); 2) GABA aumenta significativamente (p<0.001) por efecto de AOA durante las etapas de maduración estudiadas. Se sugiere que el efecto inhibitorio del GABA durante el período perinatal podría deberse a la maduración de los distintos receptores gabaérgicos durante el desarrollo sexual.

95. Acción de acil-CoA sintetasas y de acil-CoA tioesterasas específicas para ácido araquidónico en el mecanismo de acción hormonal. Pablo Mele, Paula Maloberti, Paula Bey, Florencia Cano, Cristina Paz, Ernesto Podestá.

*Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.
e-mail: biohrdc@fmed.uba.ar*

ARTIS_t (Arachidonic acid-related thioesterase involved in steroidogenesis), un miembro de una nueva familia de acil-CoA tioesterasas, libera ácido araquidónico (AA), el cual regula la transcripción y traducción de proteínas obligatorias en la esteroidogénesis. ARTIS_t recombinante es capaz de liberar AA utilizando como sustrato araquidonil-CoA ($K_m=4.2$ uM, $V_{máx}=948$ nmol AA/minxmg). Conjuntamente con ARTIS_t ha sido descrita una acil-CoA sintetasa (ACS₄), específica para AA, regulable por hormonas. Utilizando un inhibidor específico de esta enzima, triacsin C, se observó una disminución significativa dosis dependiente en los niveles de esteroides en células Y1 en presencia del inhibidor (ACTH (5 mUI/ml) + triacsin C 0; 0.5; 1 y 5 uM: 153±11, 119±8*, 93±6***, 98±9** ng de esteroides/ml, respectivamente. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001). Coincidentemente con su participación como fosfoproteína regulatoria en sistemas PKA y PKC dependientes, ARTIS_t recombinante es fosforilada in vitro por ambas quinasas. En este sistema se encuentra descrita la participación obligatoria de un transportador de acil-CoA, el DBI (diazepam binding inhibitor). Dado que ACS₄, DBI y ARTIS_t se encuentran en tejidos esteroidogénicos y no esteroidogénicos, se sugiere que estas proteínas podrían constituir un nuevo sistema para regular la transcripción de genes a través de la liberación de AA.

ONCOLOGIA II

96. Inducción de apoptosis por distintos agentes antineoplásicos en líneas tumorales murinas resistentes a vincristina (VCR) y a doxorubicina (DOX). *Eloisi Caldas Lopes, *Mariana García, @Luciano Vellón, *Elida Alvarez y *Silvia Hajos.

**Cátedra de Inmunología - Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA-CONICET) y @Academia Nacional de Medicina Buenos Aires.*

Diversos agentes antineoplásicos utilizan el mecanismo de apoptosis para la destrucción de las células tumorales. Nuestro objetivo fue determinar la resistencia cruzada entre drogas

utilizadas en leucemias como el etopósido (VP-16), metotrexato (MTX), ciclofosfamida (CTX), dexametasona (DEX), citarabina (Ara-C) y L-asparaginasa sobre líneas leucémicas murinas resistentes a vincristina (LBR-V160), doxorubicina (LBR-D160) y sensibles (LBR-), así como determinar la relación entre resistencia a multidrogas y apoptosis. El efecto de los agentes antitumorales fue determinado por incorporación de timidina tritiada, calculándose la IC_{50} para cada droga. Se demostró que VCR presentó resistencia cruzada con DOX, VP-16, DEX y en bajo nivel para MTX, mientras que DOX lo hizo con VP-16 y en bajo nivel con MTX. Ara-C no presentó resistencia cruzada. La apoptosis inducida por dichas drogas fue evaluada por microscopía de fluorescencia y la fragmentación de DNA por electroforesis en agarosa y citometría de flujo. Se observó que los índices de apoptosis utilizando 0,5 µg ml⁻¹ fueron para VP-16 en LBR- 63%, LBR-V160 11% y LBR-D160 6% (p<0.01) para DEX en LBR- 5%, LBR-V160 20% (p<0.01) y LBR-D160 35% (p<0.005), mientras que Ara-C y MTX no presentaron diferencias significativas entre las líneas sensibles y resistentes. Concluimos que todas las drogas con excepción de DEX presentaron correlación inversa entre el nivel de resistencia y el grado de apoptosis.

97. Interacción de CD44 con distintas formas de ácido hialurónico en líneas tumorales T murinas. Glenda M Ernst*, Paula V Cabrera*, Guillermo Blanco*, Guillermo Rimoldi**, Elida Alvarez* y Silvia E Hajos*.

** Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, IDEHU. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET, **Facultad de Ciencias Veterinarias, Patología Básica, UBA.*

La interacción de CD44 con ácido hialurónico (AH) ha sido descrita como un evento clave en los procesos de invasión y metástasis. El AH es un glicosaminoglucano lineal, que en estado nativo es un polímero de 10⁶Da, sin embargo en procesos malignos se han encontrado altas concentraciones de AH fragmentado. Se ha sugerido que el AH de alto y bajo peso molecular podrían exhibir diferentes efectos biológicos. Se utilizaron dos variantes clonales de una línea de linfocitos T tumorales murinos, LBLc y LBLa, con las que se realizó su caracterización fenotípica, se estudió su capacidad invasiva, su habilidad de unión a AH entero y fragmentado y su capacidad de migración celular. LBLc y LBLa mostraron expresión similar de los marcadores CD4, CD8, CD24 y CD25, aunque presentaron diferencias en CD18 y en el receptor de ácido hialurónico: CD44. Por otra parte LBLc (CD18^{lo} y CD44^{lo}) demostró ser menos agresiva *in vivo* que LBLa (CD18^{hi} y CD44^{hi}). LBLa posee mayor capacidad de unión a AH fragmentado (sonicado) que a AH entero. La especificidad de esta unión se demostró realizando controles con hialuronidasa y con un anticuerpo anti-CD44. El índice de migración para LBLa en presencia de AH fragmentado fue de 3.2±0.4, mientras que el de AH entero fue de 1.7±0.3. LBLc mostró índices de migración menores y similares con ambas formas de AH (1.6±0.2 para AH entero y 1.13±0.4 para AH fragmentado). Sugerimos que es posible que la interacción CD44-AH de bajo peso inicie los mecanismos de migración y adhesión en las células LBLa, aumentando su potencial de invasión.

98. Expresión de CD44s y CD44v3/v6 en melanomas humanos. Stella Ranuncolo, José Lastiri, Dora Loria, Susana Gorostidy, Ana Morandi, Virginia Ladeda, Roxana del Aguila, Elisa Bal de Kier Joffé, Guadalupe Pallotta, Lydia Puricelli.

Area de Investigaciones, Instituto de Oncología "Angel H. Roffo" y Serviciode Oncología Clínica del Hospital Italiano de Buenos Aires.

La capacidad de adhesión de las células tumorales es una característica determinante del fenotipo metastásico y puede alterar el pronóstico de algunos tumores humanos como los melanomas. El CD44, principal receptor para ácido hialurónico, ha sido implicado en la progresión tumoral. Nuestro objetivo

fue estudiar la expresión de CD44 standard y sus variantes v3 y v6 en 54 melanomas primarios, de pacientes vírgenes de tratamiento. Se empleó la técnica de inmunohistoquímica. Los resultados se asociaron con los parámetros clínicos y patológicos de cada paciente. 53/54 tumores expresaron CD44s asociado a la membrana plasmática, aunque fue variable el número de células con tinción específica. Ninguno de los tumores expresó las variantes v3 ni v6. No se encontró asociación entre los niveles de tinción de CD44 y la edad o sexo del paciente. Tampoco se observó asociación con el tipo de crecimiento del tumor (radial o vertical), la localización y el índice de Breslow. Sin embargo, se halló una correlación positiva entre la expresión de CD44 y el nivel de Clark (Pearson, $p < 0.001$). Así, sólo el 20 % de los melanomas Clark 1 muestran alta expresión de CD44 (más del 50% de las células positivas) comparada con el 82% de los Clark IV. Aunque se observó que los pacientes con alta expresión de CD44 tienen peor supervivencia, no se encontró diferencia significativa con aquellos que expresan bajos niveles (Test de COX). En conclusión, se determinó que los melanomas expresan sólo CD44s. Sin embargo, los niveles de expresión no son independientes ya que se asocian con el grado de Clark. Si bien se encontró asociación con supervivencia, la falta de significación estadística con el número de pacientes estudiados, indicaría que no puede utilizarse como marcador pronóstico.

99. La lovastatina induce cambios morfológicos asociados al citoesqueleto y afecta los principales pasos de la invasión tumoral en un modelo de carcinoma mamario. Hernán Farina, Débora Bublik, Daniel Gomez y Daniel Alonso.

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes. (hgfarina@unq.edu.ar)

Previamente reportamos la acción antitumoral y antimetastásica de la lovastatina (LST), un inhibidor de la biosíntesis de colesterol, en el modelo murino F3II de carcinoma mamario. Se evaluaron los efectos in vitro de dosis no citotóxicas clínicamente relevantes de LST (5-10 μM) sobre el citoesqueleto y sobre adhesión, proteólisis y migración tumoral. LST indujo redondeamiento de las células F3II. Anticuerpos específicos marcados con fluoresceína mostraron desorganización de la actina cortical y alteraciones en la distribución de los microtúbulos. La adhesión al sustrato de las células F3II descendió con el pretratamiento durante 24 h con LST (Control: 221 ± 19 vs. LST 10 μM : 39 ± 4 células/ mm^2 ; $p < 0.001$). Los estudios zimográficos y de caseinólisis radial de medios condicionados provenientes de monocapas de F3II tratadas con LST revelaron un descenso dosis-dependiente de la uroquinasa y un aumento del activador tisular del plasminógeno, mientras que la secreción de metaloproteasas no resultó afectada. LST disminuyó la migración de las células F3II en el ensayo de herida en placa, efecto que pudo ser revertido con mevalonato (200 μM), precursor de la síntesis de colesterol. Los datos sugieren que la acción antitumoral de LST en el modelo F3II podría estar mediada por sus efectos sobre el citoesqueleto y los principales pasos de la invasión.

100. Participación de la IL-10 en la inmunomodulación inducida por una dosis baja de ciclofosfamida (Cy) en ratas portadoras de un linfoma. Pablo Matar, Viviana Rozados, Silvia Gervasoni, O Graciela Scharovsky.

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas U.N.R. Rosario. (ogs@citynet.net.ar)

Anteriormente demostramos el efecto inmunomodulador antimetastático de una dosis baja de Cy. El objetivo de este trabajo fue investigar los mediadores solubles y las células inmunes responsables del efecto observado. Se prepararon medios condicionados (MC) de subpoblaciones de células esplénicas de ratas portadoras del linfoma TACB tratadas con Cy (día 14) (Grupo I), y de portadoras del tumor no tratadas con la droga (Grupo II). Se evaluó el efecto de los MC sobre

la linfoproliferación y se determinaron sus concentraciones de IL-10 y TGF- β por ELISA. Se midió también la concentración de IL-10 sérica. Los resultados mostraron que los MC de linfocitos T del grupo II inhibieron la linfoproliferación y presentaron niveles elevados de IL-10 y TGF- β ; en cambio, los del grupo I no afectaron la proliferación celular normal y las dos citoquinas presentaron niveles inferiores a los del grupo II ($p < 0.001$). Ensayos de adición y neutralización de citoquinas indicaron que IL-10, y no TGF- β , es el factor responsable de la inhibición de la linfoproliferación por los MC del grupo II. La IL-10 sérica aumentó progresivamente en los animales del grupo II, mientras que descendió en los del grupo I después de la inyección de Cy (Día 21: $p < 0.0001$). El tratamiento de animales portadores del tumor con una dosis baja de Cy inhibió la producción de citoquinas inmunosupresoras. El descenso en la producción de IL-10, a nivel local y sistémico, sería el responsable de la restauración de la linfoproliferación, lo que permitiría el desarrollo de una respuesta inmune antimetastásica efectiva.

101. Potenciación de doxorubicina por DETA-NO en una línea celular de adenocarcinoma mamario murino.

Francisco Schöpfer, María Jasnís, Elisa Bal de Kier Joffé y Juan Poderoso.

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas y Area Investigación, Instituto de Oncología "Angel H Roffo", Universidad de Buenos Aires. fschopfer@hotmail.com

La doxorubicina (DOX) es una antraciclina antitumoral que ejerce su acción citotóxica a través de reacciones con el DNA y de la formación de anión superóxido (O_2^-). Este último radical reacciona con el óxido nítrico (NO) ($k = 1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) formando el poderoso oxidante peroxinitrito. El objetivo de este trabajo fue inducir la formación intracelular de peroxinitrito mediante la combinación de DOX y del dador de NO, Deta-NO, para aumentar el porcentaje de muerte celular. La oxidación de la DOX fue lineal respecto de su concentración y la exposición de albúmina a 0-4 mM DOX reducida y 1.7 mM NO mostró nitración de residuos tirosina. Se estudió el efecto de los tratamientos combinados en células LM3 incubadas durante 24 o 48 hs en presencia de 0-4 μM de DOX, 0-2 mM de DETA-NO o de ambas. El tratamiento con DOX determinó un aumento de la muerte celular concentración dependiente (método MTS), mientras que el cotratamiento con DETA-NO aumentó aún más la citotoxicidad de la DOX (efecto sinérgico). Los porcentajes de muerte celular por tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio en controles, 1 mM DETA-NO, 1 μM DOX y la combinación de ambos fueron 1.8 ± 0.9 , 15.9 ± 0.8 , 15.6 ± 2.5 y $48.7 \pm 1.1\%$ respectivamente confirmando un efecto sinérgico de potenciación. El sinergismo NO-DOX puede tener implicancias terapéuticas y disminuir la toxicidad de altas dosis de DOX.

102. Receptores de progesterona (RP) en carcinomas mamaros murinos progestágeno-independientes (PI). Luisa Helguero, Asaithambi Gopalan Shyamala, Caroline Lamb, Claudia Lanari, Alfredo Molinolo.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). molinolo@dna.uba.ar

Mostramos que carcinomas mamaros murinos progestágeno independientes (PI) pueden responder a la terapia hormonal (PI-R) o no (PI-NR). Por Western Blot (WB), utilizando una serie de anticuerpos (Acs), los PI-R expresan niveles altos de RP (isoformas B, A y 78kDa) mientras que en los PI-NR no se observan bandas específicas. Con otro Ac específico para RP B sí se observó una banda intensa en los PI-NR. La funcionalidad de estos RP se confirmó inhibiendo la proliferación celular con oligonucleótidos antisentido de RP B en ambos tipos de tumores. Para confirmar la especificidad de estos resultados se evaluó la expresión del RP por inmunohistoquímica con los mismos Acs usados en WB, y la presencia de ARNm del RP con la técnica de protección a la RNasa. En los 4 tumores PI-R estudiados se observó un 60-

80% de marcación nuclear epitelial específica con todos los Acs usados. En los 3 tumores PI-NR sólo se observó marcación específica usando el Ac de RP B. Estos resultados confirman los resultados anteriormente obtenidos por WB. En estudios de ARNm se protegió un fragmento del tamaño esperado, correspondiente al RP en una línea tumoral PI-R y una PI-NR observándose similar intensidad del mismo en ambos tumores. Estos resultados compatibles con la hipótesis que RP alterados, no reconocibles por ciertos Acs juegan un rol en el crecimiento PI-NR.

103. Interacciones entre receptor de estrógeno alfa (REa) y progesterona (RP) median la proliferación celular inducida por progestágenos en un adenocarcinoma mamario murino. Caroline Lamb, Luisa Helguero, Alfredo Molinolo, Claudia Lanari.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental.
e-mail: molinolo@dna.uba.ar*

En cultivos primarios de un carcinoma mamario murino progestágeno-dependiente (C4-HD) demostramos que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido de REa (asREa) y con el antiestrógeno ICI 182780 inhibe la proliferación celular inducida por acetato de medroxiprogesterona (MPA). Las hipótesis de trabajo fueron: 1) el asREa inhibe la síntesis de RE e indirectamente la de RP; 2) se inhibe una posible interacción entre REa y RP necesaria para la acción del MPA. Se evaluaron los niveles de RP por la técnica de célula entera luego de incubar 48 hs células C4-HD en presencia de asREa (5 ug/ml), en condiciones que inhibían la estimulación por MPA; no se encontraron diferencias con los controles no incubados (Ej: control: $23,6 \pm 4,4$ fmoles/ 10^5 células; asREa: $25 \pm 6,5$ fmoles/ 10^5 células). También se inmunoprecipitaron homogenatos de C4-HD con un anticuerpo policlonal que reconoce las isoformas A y B del RP (C-20, Santa Cruz); se separaron las proteínas en SDS-PAGE 12% y se reveló con un anticuerpo policlonal que reconoce al REa (MC-20, Santa Cruz). Se observó una banda inmunoreactiva de 67 kDa correspondiente al REa. Resultados similares se obtuvieron con glándula mamaria y útero. Estos resultados sugieren que complejos REa-RP serían necesarios para la estimulación por MPA; estos complejos no serían exclusivos del tejido tumoral.

INMUNOLOGIA II

104. Determinación de ADNemia del Virus de Epstein-Barr (VEB) en pacientes trasplantados. Lorena Vettorazzi, Teresita Alvarelos, Graciela Boccardo, Valeria Mas.

Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética. Hospital Privado. Centro Médico de Córdoba-Fundación Nefrológica (e-mail: bmhla@arnet.com.ar).

El Desorden linfoproliferativo post-trasplante (DLPT) asociado al VEB es una de las principales causas de morbi-mortalidad en trasplante renal. La identificación temprana es de gran importancia en la sobrevida de los pacientes. Se estudió presencia de ADN VEB en plasma y en linfocitos de sangre periférica (PBMC), utilizando Nested PCR. Los pacientes estudiados fueron 1) individuos inmunocompetentes al azar (n=10), 2) pacientes con diagnóstico de Mononucleosis Infecciosa (MI) (n=9), 3) trasplantados renales con clínica de DLPT (n=4) y sin clínica de DLPT (n=9). De los inmunocompetentes 8 de 10 fueron (+) para VEB en PBMC. En el grupo de pacientes con MI, 7 de 9 fueron (+) en PBMC y 3 de 9 en plasma. Todos los trasplantados con clínica (4) de DLPT fueron (+) en PBMC y en plasma. Sólo 5 de los 9 trasplantados sin clínica de DLPT fueron (+) en PBMC y plasma. La técnica Nested PCR es sensible y específica para la detección del VEB. Esta técnica no sería la adecuada para la identificación precoz de los pacientes de alto riesgo a desarrollar DLPT. Estos resultados preliminares sugieren la necesidad de cuantificar la carga viral del

VEB y utilizarla como marcador pronóstico temprano para el diagnóstico de DLPT.

105. Subpoblaciones tímicas, niveles séricos de factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), y receptores solubles p55 y p75 en la infección con *Trypanosoma cruzi* en ratones C57BL/6 y BALB/c. Eduardo Roggero, Silvia Revelli, Irene Nepomnaschy, Isabel Piazzon, Oscar Bottasso.

IHEMA, Acad. Nac. Medicina, Inst. de Inmunología, Fac. Cs. Médicas, Rosario. Bottasso@arnet.com.ar

La infección experimental con *T.cruzi* en ratones C57BL/6 y BALB/c revela una enfermedad aguda con pérdida progresiva de la corteza tímica, y fragmentación del ADN genómico de dichos timos. El proceso es letal en la cepa C57BL/6, no así en los ratones BALB/c, que logran recuperarse. Dada la participación del FNT- α en la apoptosis de timocitos, se investigaron las subpoblaciones tímicas y los niveles circulantes de FNT- α y sus receptores solubles (p55 y p75). Los timocitos se analizaron al día 17 post-infección (pi) por citometría de flujo utilizando AcMo anti-CD4 y CD8; observándose una disminución en el número absoluto y relativo de células CD4+CD8+ (DP). Los resultados (media \pm ds, n=6) fueron, BALB/c: $55,2 \pm 8,3$ (*T. cruzi*), 70 ± 6 (normales, $p < 0,01$). En C57BL/6: $32 \pm 9,5$ vs $75,5 \pm 9,5$, $p < 0,001$. La proporción preservada (%) de las DP (respecto de su respectivo control) fue: 79 ± 19 (BALB/c) vs 43 ± 16 (C57BL/6) ($p < 0,004$). Las mediciones en suero (pg/ml, día 21 pi) fueron FNT- α , BALB/c $489,7 \pm 182$ (8); C57BL/6 833 ± 320 (8) ($p < 0,02$); p55 BALB/c: $204 \pm 62,8$, C57BL/6: 433 ± 168 ($p < 0,003$); p75 BALB/c: $1748 \pm 441,7$, C57BL/6: $2716 \pm 247,7$ ($p < 0,001$). La mayor caída de la población DP de los ratones C57BL/6 se asocia con niveles más altos de FNT- α y sus receptores solubles.

106. Respuesta al lipopolisacárido (LPS) en ratones con infección aguda por *Trypanosoma cruzi* de distinta severidad. Niveles circulantes de factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), y los receptores solubles p55 y p75. Eduardo Roggero, Silvia Revelli, Oscar Bottasso.

Instituto de Inmunología, Fac. Cs. Médicas, Rosario. e-mail Bottasso@arnet.com.ar

Dado que la mayor severidad de la infección aguda experimental con *T.cruzi* de los ratones C57BL/6 (C57) respecto de los BALB/c (BAL) podría estar vinculada a diferencias en la respuesta a componentes del parásito similar a endotoxinas, nos propusimos estudiar los niveles circulantes de FNT- α y sus receptores solubles (p55 y p75) ante el desafío con LPS. Se utilizaron animales infectados 21 días antes, a los cuales se les efectuó una inyección ip de LPS (200ug). Las muestras de sangre se obtuvieron previo, 90 min y 4 horas después a dicha intervención. Los valores fueron los siguientes (pg/ml, media \pm es, n=4-6 animales por grupo): **Previamente**, FNT- α BAL 490 ± 88 , C57 829 ± 149 ($p < 0,05$); p55 BAL 211 ± 28 , C57 384 ± 61 ($p < 0,05$); p75 BAL 1763 ± 209 , C57 2681 ± 110 ($p < 0,01$); **90 minutos**, FNT- α BAL 5612 ± 48 , C57 16797 ± 924 ($p < 0,001$), p55 BAL 648 ± 47 , C57 1204 ± 24 ($p < 0,001$), p75 BAL 2140 ± 74 , C57 2532 ± 20 ($p < 0,001$); **4 horas**, FNT- α BAL 5478 ± 560 , C57 18969 ± 247 ($p < 0,001$); p55 BAL 608 ± 33 , C57 1264 ± 48 ($p < 0,001$); p75 BAL 2692 ± 36 , C57 2420 ± 93 (ns). Los animales con infección agravada denotan un incremento mucho mayor en los niveles de FNT- α ante el desafío con LPS, el cual no se acompaña de un aumento proporcional en los valores de receptores solubles para dicha citocina.

107. Producción de IL-18 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. María Inés Antúnez, Rita L. Cardoni.

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. M. Fatale Chabén" ANLIS, Bs. As. (mantunez@mail.retina.ar)

La producción de IFN-g en las fases iniciales de la infección con *T. cruzi* es clave para la eliminación del parásito. Las células del bazo de los ratones C3H producen IFN-g e incrementan su actividad NK a los 2 días post-infección (pi), mientras que en los BALB/c, más susceptibles, esto ocurre a los 14 días pi. Sin embargo, a los 2 días pi ambas cepas liberan similares niveles de IL-12p70. Estudiamos, por ELISA de captura, la producción de IL-18, otra citoquina estimuladora de la liberación de IFN-g y de células NK, en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con *T. cruzi*, cepa Tulahuén. En los C3H la liberación espontánea de IL-18 incrementó significativamente a los 2 días pi y alcanzó niveles máximos en la 3er semana pi (Normales: <25pg/ml, 2pi: 51±11, 21pi: 273±39 pg/ml). Los BALB/c sólo presentaron valores detectables a los 14 días pi (35±9 pg/ml). Por otro lado, no se encontró un incremento de IL-18 en el suero de los ratones infectados. En la fase crónica de la infección no se detectó liberación de la citoquina en el bazo, aun ante el estímulo con LPS. Estos datos sugieren que la producción temprana de IFN-g, y por consiguiente la resistencia, están relacionados con la presencia simultánea de IL-12p70 e IL-18. Financiación: CONICET y FONCyT PICT 5-139-2330.

108. Papel de la Interleuquina (IL)-10 en la actividad citotóxica inducida por M.tuberculosis (Cx-Mt) en tuberculosis (TB). Silvia de la Barrera, Mercedes Alemán, Marta Finiasz, Claudia Borghetti, Eduardo Abbate, María Sasiain.

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina y Neumonología Hospital Muñiz, Buenos Aires. (jjarellano@intramed.net.ar)

En TB existe una disminución de Cx-Mt acentuada por una TB previa. Se analizó la naturaleza de las células citotóxicas inducidas por el Mt en pacientes con TB y en individuos sanos (N), los mecanismos de presentación antigénica empleados por los macrófagos (M) en el ensayo citotóxico y su modulación por IL-10. Se estudiaron 8 pacientes con TB previa (P) y 11 sin TB previa (No-P) y 9 N. Se aislaron células CD4, CD8 y Tgd de PBMC estimulados 7 días con Mt (E). Se emplearon como células blanco (B) a M autólogos pulsados con Mt, con o sin inhibidores de vías clásicas para MHC clase I y II, Brefeldina (MBr) o Cloroquina (MC). Se incubaron 4 hs a E y B en relación 40:1, se determinó % de Cx. Se observó: a) inducción diferencial de E, No-P: CD4= 38+3, CD8=18+3, Tgd=27+4; P: CD4=28+3, CD8= 8+1, Tgd= 37+3, N: CD4=43+5, CD8=28+3, Tgd=19+2. En N el agregado de IL-10 a PBMC inhibió Cx-CD4 (24+5, p<0.05) y Cx-CD8 (8+2, p<0.05) y aumentó Cx-Tgd (28+4, p<0.05). b) En N, el uso de MBr o MC no inhibió Cx-CD4 y Cx-CD8. En No-P, MBr inhibió a Cx-CD8, y en P, MC y MBr inhibieron Cx-CD4 y Cx-CD8. En N, P y No-P, Cx-Tgd fue inhibida por MBr. Los M de TB presentan a Mt por vías clásicas y en los de N por vías alternas. El agregado de IL-10 a M de N, inhibió las vías alternas para CD4 y CD8. La IL-10 estaría involucrada en la inducción diferencial de Cx-CD4 y -CD8, así como del aumento de Cx-Tgd y el deterioro de las vías alternas de presentación antigénica en M en TB.

109. Papel modulador de la Interleuquina (IL)-18 en la inducción de la actividad citotóxica (Cx) inducida por hsp65 (Cx-65) en lepra. Regulación por IL-13. Silvia de la Barrera, Mercedes Alemán, Susana Fink, María Farfán, Graciela Pizzariello, María Sasiain.

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina y Dermatología Hospital Muñiz, Buenos Aires. (jjarellano@intramed.net.ar)

Anteriormente hemos demostrado que las células Tgd y NK actúan como reguladoras de Cx-65 en pacientes paucibacilares (PB) y normales (N) por producción de IFN γ . En multibacilares (MB), la baja Cx-65 correlacionaba con una baja función NK y producción de IFN γ . Si bien IL-18 induce IFN γ

en células T y NK, en ausencia de IFN γ puede inducir IL-13 (Th2) en células NK. Nuestro objetivo fue analizar el papel de IL-18 e IL-13 en la inducción de Cx-65. Cél. Efectoras (E)= PBMC + hsp65 (7 días) con o sin IL-18, -13, -12 o AcMo contra estas CKs. Cél. blanco (B)=macrófagos autólogos + hsp65, marcados con 51-Cr. Se incubaron E y B, 4 hs (relación E/B= 40:1), se determinó el % de Cx. La neutralización de IL-18 inhibió Cx-PB (n=8), (44+6, + a18= 20+4, p<0.05), y N(n=9, 29+5, +a18= 12+2, p<0.05). IL-18 aumento Cx en MB (n=11, 12+1, 18= 38+4, p<0.01) y MB que toman talidomida, MB-T (n=6) (7+1, 18=25+5 p<0.05), PB (67+4, p<0.05) y N (43+2, p<0.01). El efecto fue parcialmente inhibido por anti-IL12. IL13 inhibió Cx-IL18 en N (17+5, p<0.05) y PB (38+8, p<0.05). Anti-IL13 + IL18 produjo un mayor aumento en MB (48+4, p<0.005) y MB-T (33+4, p<0.05). La IL-18 modula la inducción de Cx-65 mediante un mecanismo parcialmente dependiente de IL-12, siendo regulada por la presencia de IL-13 en etapas muy tempranas de la inducción.

110. La activación de monocitos por el lipopolisacárido de *Brucella abortus* es mediada por CD14. Mariela Cahanovich, Eduardo Domingo, Ignacio Moriyon, Carlos Fossati, Guillermo Giambartolomei.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA), Laboratorio de Inmunogenética, Htal. de Clínicas J. San Martín, UBA, Universidad de Navarra., Pamplona, España. (e-mail: ggiambart@ffybu.uba.ar)

Las características físicas, químicas y biológicas del lipopolisacárido (LPS) de bacterias del género *Brucella* difieren significativamente respecto de las del LPS de la gran mayoría de las bacterias Gram negativas. Hasta el presente se desconoce el camino metabólico por el cual el LPS de *Brucella* induce sus efectos biológicos. Nuestro objetivo fue determinar la función de CD14 y la proteína de unión del LPS (LBP) en la activación celular mediada por LPS de *Brucella*. Con tal motivo células de la línea THP-1, pretratadas o no con 1,25-dihidroxitamina D3 (VD3), (inductor de la expresión de CD14) fueron incubadas con distintas concentraciones de LPS de *B. abortus* y luego del cultivo se evaluó mediante ELISA la producción de IL-6 e IL-10. El tratamiento con VD3 confirió a las células la capacidad de secretar citoquinas al ser estimuladas con LPS de *B. abortus* de una manera dosis dependiente. Un anticuerpo monoclonal anti-CD14 (MY4) bloqueó la respuesta generada por el LPS de *B. abortus*. La ausencia de suero o la presencia de polimixina B en el medio de cultivo inhibieron la secreción de citoquinas inducida por el LPS de *Brucella*, sugiriendo que LBP cumple un rol determinante en la activación celular generada por el LPS de *B. abortus*. Estos resultados indicarían que el receptor CD14 y LBP estarían involucrados en el señalamiento celular inducido por el LPS de *B. abortus*.

111. Polarización de la respuesta inmune celular contra proteínas de *Brucella* en pacientes brucelosos. Mariela Cahanovich, Jorge Wallach, Alejandro Velikovskiy, Pablo Baldi, Carlos Fossati, Guillermo Giambartolomei.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA) y Servicio de brucelosis, Htal. Muñiz. (e-mail: ggiambart@ffybu.uba.ar)

La gran mayoría de los trabajos sobre antígenos de *Brucella* se refieren al LPS. La caracterización de antígenos proteicos es escasa. Nuestro objetivo fue estudiar la respuesta inmune celular contra antígenos proteicos citoplasmáticos de *Brucella* utilizando como modelo la proteína de 18 kDa (p18) y el extracto citoplasmático libre de LPS (Cyt) (ya descriptos por nuestro laboratorio) en pacientes brucelosos. Para ello se determinó la capacidad de estos 2 antígenos de inducir proliferación *in vitro* de linfocitos y mediante ELISA y RT-PCR la producción de citoquinas del tipo Th1 y Th2. Los linfocitos de 11 de 18 pacientes proliferaron *in vitro* en respuesta a Cyt mientras que

las células de 7 pacientes no. Sólo las células de 2 pacientes estudiados proliferaron en respuesta a p18. Las células de los pacientes respondedores produjeron INF-gamma e IL-2 al ser estimuladas *in vitro* con Cyt. Las células de los pacientes no respondedores no produjeron un patrón característico Th1 o Th2. Los linfocitos de estos pacientes fueron incapaces de aumentar la expresión del gen de IL-2. Las células de individuos normales no mostraron respuesta celular contra Cyt y p18. Todos los pacientes presentaban anticuerpos específicos contra Cyt y p18. Los resultados muestran que la polarización en la respuesta celular puede deberse a un desbalance entre la respuesta Th1 y la Th2.

NEUROCIENCIAS I

- 112. Mecanismos moleculares de neuroprotección de la progesterona (Pg).** Florencia Labombarda, Susana González, Claudia González Deniselle, Rachida Guennoun, Paulina Roig, Analía Lima, Michael Schumacher, Alejandro De Nicola.

*IBYME, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA e INSERM U488, París, Francia.
e-mail: denicola@dna.uba.ar.*

La Pg posee efectos neurotróficos sobre el sistema nervioso. En este trabajo se estudió parte de los mecanismos neuroprotectores de la Pg en un modelo de transección torácica completa de médula espinal de rata. Por técnicas inmunohistoquímicas se estudió la expresión de la enzima colina acetil transferasa (ChAT), índice del normal funcionamiento de las motoneuronas. Se cuantificó por densitometría computarizada la intensidad y el área de inmunoreacción de las motoneuronas ubicadas debajo de la lesión, en ratas controles (CTL), transectadas (TRX) y TRX que recibieron Pg (4mg/Kg/día x 3 días s.c.) (TRX+Pg). En las TRX la densidad de inmunoreacción (intensidad/um²) disminuyó (CTL: 0.37 ± 0.05 vs TRX: 0.20 ± 0.01; p<0.001), mientras que la Pg aumentó la expresión de ChAT (0.20 ± 0.01 vs 0.34 ± 0.04; p<0.001). Además se determinó por hibridización *in situ* el ARNm de la proteína asociada al crecimiento neuronal (GAP-43), como parámetro de regeneración axonal. El n° granos/área aumentó en TRX (TRX: 37.25 ± 9.80 vs CTL: 5.50 ± 1.72; p<0.01), mientras que se produjo un aumento aún mayor en TRX+Pg (TRX+Pg: 59.75 ± 11.71; p<0.01). Los efectos sobre la expresión de ChAT y el ARNm de GAP-43 serían parte de los mecanismos neuroprotectores de Pg en la injuria aguda de la médula espinal.

- 113. Relación entre la inmunoreactividad para Fos y el receptor para Mineralocorticoides (MR) en zonas del cerebro ligadas a la inducción del apetito salino por acetato de desoxicorticosterona (DOCA)**

El modelo de inyección de DOCA con doble preferencia de agua y NaCl al 3% en la bebida, donde se induce el apetito salino, permite el estudio del periodo pre-hipertensivo. En este trabajo se estudió cuales serían las poblaciones neuronales involucradas en dicha inducción en ratas tratadas durante 9 días con DOCA (10mg/rata/día en días alternos). Mediante técnicas de inmunocitoquímica y análisis computarizado de imágenes se determinó la presencia de MR y de Fos, éste último como parámetro de activación neuronal. El tratamiento indujo la expresión de Fos (n° de células ir/área, test de Student) en el núcleo mediano preóptico (MnPO) (CONTROL (CT): 14.11±2.62, DOCA: 40.66±5.13, p<0.002), área preóptica medial (CT:74.04±8.96, DOCA:132.80±19.98 p<0.05), núcleo de la estria terminal (BST) (anterior: CT: 34.2±5.44, DOCA:67.77±13.86 p<0.05 y posterior: CT: 56.45±5.59, DOCA: 97.18 ±5.24, p<0.01) y núcleos paraventricular (CT:34.38±1.30, DOCA: 156.10±30.57, p<0.01) y supraóptico (CT:0, DOCA: 23.85±2.25, p<0.0005). MR se expresó en hipocampo (como control positivo del anticuerpo), MnPO y BST anterior. Los datos demuestran la existencia de poblaciones

neuronales Fos+/MR-, en las que DOCA actuaría por mecanismos de activación no genómicos, además de regiones Fos+/MR+, que sugieren un mecanismo clásico mediado por el receptor intracelular.

- 114. Estudios de neurotoxicidad *in vitro* y parámetros bioquímicos en líquidos cefalorraquídeos (LCR) de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).** Karina Ricart (1), Roberto Sica (2), Alejandra Latini (3), Raquel Kremer (3), Andres Villa (2), Mónica Fiszman (1).

(1) Laboratorio de Neurociencias, Centro de Investigaciones Médicas Albert Einstein. (2) División Neurología, Hospital Ramos Mejía. (3) CEMECO, Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. e-mail: fiszman@connmed.com.ar.

Se examinó el papel de los radicales libres y la excitotoxicidad en la etiología de la ELA. El objetivo fue el análisis de la neurotoxicidad que produce el LCR de pacientes con ELA y correlacionarlo con la concentración de glutamato y nitritos. **Métodos:** Cultivos primarios neuronales de corteza fueron expuestos a LCR y la viabilidad celular se estudió a las 24 horas. Se realizaron determinaciones de nitritos (NO₂⁻) por detección colorimétrica y de glutamato por cromatografía gaseosa. **Resultados:** Se observó: 1) El glutamato aumentado en los ELA (ELA: 4,95±0,61uM, n=11; Controles: 1,2±1uM, n=25; media±DS, p=0,023). 2) La concentración de NO₂⁻ en los controles (n=21) está por debajo de la sensibilidad del método (< 3,2 uM), mientras que 10 de las 30 muestras de ELA presentan niveles detectables de NO₂⁻ (7,12±0,99uM, n=10). 3) Los LCR de ELA disminuyeron la viabilidad neuronal (% con respecto a los cultivos no expuestos: ELA: 64±7, n=7; Controles: 93±4, n=7; p<0,004). El análisis de los tres parámetros en conjunto (NO₂⁻, glutamato y viabilidad) se realizó en 4 muestras de ELA y 2 controles. Se observó que el LCR de ELA produce toxicidad y el glutamato y los nitritos están aumentados, mientras que en los controles no hubo cambios. Estos resultados confirman que el glutamato aumentado puede contribuir al desarrollo y/o evolución de la ELA.

- 115. Allopregnenolona intracerebroventricular inhibe la ovulación y altera la función luteal en la rata.** Myriam Laconi & Ricardo Cabrera.

Laboratorio de Investigaciones Neuroquímicas Comportamentales y Endocrinas Unidad de Neuroquímica y Farmacología del Comportamiento. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. e-mail: mlaconi@lab.cricyt.edu.ar

La ovulación y la posterior diferenciación de las células de la granulosa ovárica en luteínicas son procesos inducidos por LH. A su vez, GABA inhibe la liberación de LH. Allopregnenolona (All) es un neuroesteroide con potentes acciones sobre el sistema nervioso central, modulando sistemas de neurotransmisión entre ellos el GABAérgico. Hemos demostrado anteriormente, el efecto inhibitorio de All sobre la liberación hipotalámica de LH y la reversión de éste con bicuculina (B). Objetivo: evaluar las alteraciones en la función ovárica causadas por la inyección icv de All (6uM), vehículo (V) y B 9,8 µM en ratas adultas. En la mañana del preestro fueron inyectadas con All, V y B y 24 hs después (estro) fueron sacrificadas. Se realizó el recuento en fresco de los ovocitos y los ovarios fueron fijados para estudios de microscopía óptica y electrónica. Por otra parte, se determinaron los niveles de DA y DOPAC por HPLC en hipotálamo medio basal (HMB) y área preóptica (APO). All inhibió la ovulación (frecuencia de ovulación All 0/7, V 7/7, Fisher test p< 0,0005). B bloqueó el efecto de All, sobre la ovulación (5/7 p< 0,01). All inhibió la apoptosis en las células luteales (cuerpos apoptóticos con All 2,7± 0,8 V 23 ± 2,6 t-test p< 0,0001, n =20). Los niveles de DA en HMB y APO aumentaron significativamente respecto a V (t-test p< 0,005 y 0,05). Conclusión: All inhibiría la ovulación, mediante

la estimulación de GABA y DA hipotalámicas. La estimulación en la liberación de DA inducida por All en HMB inhibiría la liberación de gonadotropinas por mecanismos no genómicos que involucrarían la modulación del receptor GABA_A. Además, All tendría un rol protector sobre las células luteales contra los mecanismos de apoptosis, inhibiéndola o retrasándola.

116. Potenciales Relacionados a Eventos en niños con encefalopatía asociada a HIV. Martín Segura, Liliana Czornyj, Ana Soprano, Natalio Fejerman, Carlos Medina.

Servicios de Neurofisiología y Neurología. Hospital De Pediatría «Prof. Dr. Juan Garrahan». Buenos Aires. e-mail: mjsegura@intramed.net.ar

Objetivos: Investigar las alteraciones de los potenciales relacionados a eventos (PRE) en niños con encefalopatía asociada a HIV (EAHIV). **Métodos:** Estudiamos 19 niños (11 fem., de 4 a 10 años) con diagnóstico de EAHIV no progresiva o progresiva controlada por medicación antiretroviral. En todos se evaluó el coeficiente intelectual total (CIT) y el nivel grafomotor (NGM). Los PRE se obtuvieron empleando un paradigma oddball auditivo con una mezcla 20/80 de tonos raros y frecuentes. El registro se realizó en CZ empleando un TA de 1000 ms y filtros de 1 y 30 Hz, promediándose 30 respuestas. **Resultados:** Los pacientes con latencias prolongadas de P3 presentaron un CIT (92.5 ± 12.1 , n=8) significativamente más bajo que aquellos con P3 normal (CIT 102.2 ± 12.8 , n=11) ($p < 0.05$). Seis pacientes con latencia de P3 superior en 2 DS a la media normal correspondieron a un grupo etario significativamente mayor que el resto ($p < 0.009$), mostrando un NGM más pobre aunque sin alcanzar significación estadística. **Conclusiones:** Estos resultados sugieren: 1. Que los PRE identifican a los pacientes con EAHIV con mayor deterioro cognitivo. 2. Que dicho deterioro es superior a mayor cronicidad de la EAHIV. 3. La detección de compromiso en el NGM sugiere que el perfil del deterioro cognitivo se asemeja al de la demencia asociada a HIV en el adulto.

117. Redes implicadas en las crisis epilépticas frontales analizadas mediante métodos no lineales. Silva Walter^{1,3}, Bartolomei Fabrice¹, Wendling Fabrice², Vignal Jean Pierre¹, Consalvo Damián³, Oddo Silvia³, Giagante Brenda³, Kochen Silvia³, Chauvel Patrick¹.

¹Laboratorio de Neurofisiología y Neuropsicología, Servicio de Neurofisiología Clínica, Hospital de la Timone, Marseille. ²Universidad de Rennes, Francia. ³CONICET, Centro Municipal de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía, UBA, Argentina.

Las crisis de la región prefrontal (CPF) seguirían un patrón específico de propagación a través de redes neuronales de dos sistemas citoarquitectónicos: el lateroventral (LV) y el dorsomedial (DM). El objetivo fue analizar este patrón analizando la señal obtenida a través de la estereo-EEG (SEEG) durante las CPF. Se analizaron 10 crisis en 5 pacientes evaluados para la realización de cirugía de la epilepsia. Los electrodos profundos, con múltiples contactos, fueron implantados de acuerdo al método de Talairach. Se utilizó el coeficiente de correlación no lineal (h_2) para medir el grado y dirección de acoplamiento de la señal del SEEG de contactos ubicados en las regiones frontales LV y DM, región premotora y del lóbulo temporal. Se encontraron 3 tipos de CPF a) LV, caracterizado por un alto valor de h_2 observado entre las diferentes áreas del sistema LV; b) DM, caracterizado por un alto valor de h_2 observado entre las diferentes áreas del sistema DM y c) Mixto, caracterizado por un alto valor de h_2 observado entre las diferentes áreas del sistema LV y DM. Estos resultados demuestran la existencia de un acoplamiento funcional entre las diferentes áreas de los sistemas LV y DM y además interrelaciones entre los dos sistemas durante las CPF. Estos hallazgos podrían tener implicancias tanto en la estrategia como en el pronóstico de la cirugía de la epilepsia.

118. Las Necesidades Básicas Insatisfechas (NBI) afectan el desarrollo de la planificación en niños de edad preescolar. Beatriz Vuelta, Inés Martelli, Sebastián Lipina, Natalia Bisio, Jorge Colombo.

Unidad de Neurobiología Aplicada (UNA)(CEMIC, CONICET), Buenos Aires. e-mail: lipina@pruna.gov.ar

Los procesos de planificación, de los que participan la memoria de trabajo, la atención y el control inhibitorio, están involucrados en el funcionamiento cognitivo global y asociados a la activación de diferentes áreas corticales frontales. Los mismos han demostrado ser sensibles a la privación ambiental temprana. Con el objetivo de comparar el desempeño de poblaciones infantiles con (NBS) y sin (NBI) necesidades básicas satisfechas (criterio de pobreza, INDEC), se administró una prueba clásica de planificación (Torre de Londres; Shallice, 1982) a 120 niños de 4 y 5 años. Los datos fueron analizados según modelos de ANOVA y regresión logística multivariada. Los resultados indicaron que los niños NBI alcanzaron niveles máximos más bajos (4 años: $F_{1,61} = 7.66$ y $p < 0.01$; $B = -.53$, $SE = 0.25$ y $p = 0.03$), tiempos mayores de planificación (4 años: $F_{1,61} = 6.8$ y $p < 0.05$; 5 años: $F_{1,56} = 5.1$ y $p < 0.05$; $B = 0.18$, $SE = 0.62$ y $p < 0.01$), de ejecución (4 años: $F_{1,61} = 11.6$ y $p < 0.01$; 5 años: $F_{1,49} = 5.7$ y $p < 0.05$) y que realizaron mayor cantidad de ensayos con movimientos insuficientes (4 años: $F_{1,61} = 7.6$ y $p < 0.01$; $B = 0.51$, $SE = 0.14$ y $p < 0.01$; 5 años: $F_{1,57} = 11.8$ y $p < 0.01$). Estos hallazgos sugieren que las condiciones asociadas a las NBI afectan el desarrollo del desempeño cognitivo dependiente de circuitos prefrontales, haciendo menos eficiente el manejo de los recursos que intervienen en la construcción de planes. *Agradecimientos:* San Jorge Emprendimientos S.A., Fundación Conectar, Fundación Bunge & Born.

119. Deterioro Cognitivo Leve: la presencia de intrusiones ¿determina una predemencia? Paula Harris¹, Marina Drake², Ricardo Allegri

^{1,2} Servicio de Neuropsicología, (Centro de Estudios Médicos e Investigación Clínica)¹, Servicio de Neurología, Hospital Británico² e-mail: allegri@jede.net

El deterioro cognitivo leve (DCL) ha sido estudiado por muchos autores; sin embargo, no existe aún la posibilidad de predecir cuáles pacientes progresarán hacia una demencia. **Objetivos:** (a) establecer y comparar el perfil cognitivo de pacientes con DCL y Demencia de Tipo Alzheimer (DTA) (b) determinar si la presencia o no de intrusiones permite diferenciar dos grupos de DCL. **Pacientes y Métodos:** 81 pacientes (69 \pm 7,6 años) con DCL, 36 con DTA leve (72 \pm 7,4 años; MMSE $>$ 25) y 61 (69.1 \pm 6,5 años) controles (Co) fueron apareados por edad y escolaridad. Se les efectuó una batería neuropsicológica (evaluación de la memoria, lenguaje y funciones ejecutivas). Las intrusiones (cantidad de palabras producidas no pertenecientes a la lista) fueron tomadas en cuenta para dividir la población de DCL (grupo1: 0/1 intrusión, grupo2, 2 o más intrusiones). **Resultados:** El grupo de DCL se asemejó al de DTA en recuerdo libre e índice de olvido, mientras que en memoria lógica, aprendizaje de la lista, la recuperación con claves y lenguaje, eran más semejantes a Co. El grupo 1 de DCL se asemejó más a los pacientes con DTA que el grupo 2. **Conclusiones:** La presencia de intrusiones en la evaluación de la memoria de un paciente con DCL podría ser un predictor fuerte de pre-demencia.

REPRODUCCION I

120. Estudio de la secuencias del promotor de la hormona anti-Mülleriana (AMH) responsables de la respuesta a la FSH. Rodolfo Rey^{1,2,3}, Patricia Bedecarrás¹ y Jean-Yves Picard³.

¹Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CONICET), Hospital de Niños "R. Gutiérrez", Buenos Aires; ²Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ³Endocrinologie du Développement (INSERM), Ecole Normale Supérieure, Montrouge, Francia. e-mail: rodolforey@infovia.com.ar

En trabajos previos, mostramos que la AMH es estimulada por la FSH, pero el mecanismo molecular implicado permanecía desconocido. Secuencias que abarcan los 400 pb proximales del promotor de la AMH han sido estudiadas en detalle por varios autores, hallándose elementos de respuesta a SF1, SOX9 y GATA4, implicados en la regulación de la expresión de la AMH. Nuestro objetivo ha sido estudiar las secuencias del promotor involucradas en la regulación dependiente de FSH. Utilizamos un ensayo luciferasa, luego de transfectar, en una línea de células de Sertoli inmaduras, construcciones que contienen diferentes longitudes del promotor de AMH (3063, 1916, 423, 202 u 83 pb), con o sin mutaciones de elementos de respuesta conocidos. La adición de FSH o de AMPc o la co-transfección de una proteína Gs-alfa portadora de una mutación activadora resultaron en un aumento respectivo de ($X \pm ES$) $1,4 \pm 0,1$, $3,6 \pm 1,1$ y $3,6 \pm 1,3$ de la actividad del promotor de 3063, pero no modificaron significativamente la actividad de los promotores más cortos. La mutación de sitios SF1 y AP1 presentes a menos de 400 pb del sitio de iniciación de la transcripción no provocó modificación en las respuestas. En conclusión, los elementos de respuesta a la FSH se encuentran alejados (>1926 pb) del sitio de iniciación de la transcripción del gen de la AMH.

121. Expresión uterina de las isoformas de la Oxido Nítrico Sintetasa (NOS) en la preñez normal, y en la reabsorción inducida por LPS. Diego Ogando, Elisa Cebral, Dante Paz, Ana Franchi.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. Instituto de Neurociencia. diego@cefybo.edu.ar

El NO (óxido nítrico) cumple un rol miorelajante beneficioso en la preñez normal, pero a la vez parece cumplir un rol citotóxico en la reabsorción embrionaria en ratón. Objetivo: Estudiar los tipos celulares que expresan las isoformas de la NOS en la preñez normal y en la reabsorción inducida por LPS. Métodos: Hembras Balb/c en el día 7 de preñez se inyectan con LPS 0.5 ug/ g ó PBS, y se sacrifican a las 24 hs. Los úteros y deciduas se incuban 24 hs para la medición de nitritos por Greiss. También los tejidos se procesan para la detección de iNOS, eNOS y nNOS por western blot e inmunohistoquímica. Resultados: LPS produce un 100 % de reabsorción. Los úteros reabsorbidos (R) producen mayores niveles de NO que los úteros control (C). (C: 54.7 ± 7.9 vs R: 95.0 ± 3.6 uM/100 mg p.h., $p < 0.001$). Sin embargo las deciduas C producen niveles de NO mayores que las deciduas R, lo cual sería explicado por la alta necrosis de la última. (C: 29.2 ± 2.5 vs R: 3.1 ± 1.2 , $p < 0.001$). En el western se detecta iNOS y eNOS en todos los tejidos (salvo en la decidua R) pero no nNOS, sin apreciar diferencias. En la inmunohistoquímica se observa expresión de iNOS y eNOS en muchos tipos celulares. Los úteros R poseen en la decidua secundaria alto número de granulocitos, macrófagos y células LGL (Linfocitos grandes granulares) positivos para iNOS. Conclusiones: 1) En los sitios C y R, muchos tipos celulares expresan iNOS y eNOS. 2) Los úteros R producen niveles altos de NO, debido a la expresión de iNOS por granulocitos, macrófagos y células LGL infiltradas.

122. Desarrollo de un sistema de cocultivo entre células endometriales y embriones. Patricia Saragueta, Mónica Fazzini, Lino J. Barañao, Miguel Beato.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. Institut für Molekularbiologie und Tumorschung Marburg Germany.

El epitelio uterino recibe durante la implantación señales endócrinas y locales producidas por el embrión. La modulación de la expresión de proteínas de adhesión celular constituiría uno de los eventos claves en este proceso. Nuestro objetivo fue desarrollar un sistema de cocultivo para estudiar la interacción materno-embriónica que ocurre en los primeros estadios de la implantación. Se utilizaron líneas epiteliales (RENTROP) y estromales (UIII) uterinas de rata y embriones de ratón 4.5 dpc. Se observó que el "outgrowth" de blastocistos obtenidos en presencia de células estromales de rata (UIII) era significativamente diferente de lo observado en cocultivos con otras líneas celulares no uterinas. Las células UIII presentaron cambios morfológicos asociados a decidualización cuando se cocultivaron en presencia de embriones durante 12 días en medio DMEM-F12 con 10% FBS. Inmunocitoquímicas para desmina, marcador de decidualización, mostraron inducción localizada de esta proteína en las células UIII cocultivadas con embriones. Dado que la progesterona (P4) podría modular la diferenciación uterina, se realizaron cultivos en presencia de P4 (10^{-9} a 10^{-7} M) no observándose señal positiva para desmina en ninguna de las concentraciones ensayadas. Este sistema experimental presentado podría ser útil para estudiar los mecanismos de interacción célula-célula involucrados en la implantación.

123. Participación de la proteína epididimaria ARP y sus sitios complementarios en el ovocito, en el proceso de fusión de gametas humanas. Débora Cohen¹, Diego Ellerman¹, Dolores Busso¹, Alejandra Piazza², Edgardo Young² y Patricia Cuasnicú¹.

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET. ²Instituto de Fertilidad, Bs. As., Argentina. (dcohen@dna.uba.ar)

La proteína epididimaria DE media el proceso de fusión de gametas de rata, a través de sitios de unión en el ovocito. En el presente trabajo se estudió la participación del homólogo humano ARP (40% de homología) en el proceso de fusión. Ensayos de inmunofluorescencia (IFI) mostraron que la mayor parte de los espermatozoides (ES) reaccionados aún presentan ARP en su superficie, requisito indispensable para la fusión. Resultados obtenidos incubando ES humanos con distintas diluciones del anticuerpo anti-ARP en el ensayo de penetración de ovocitos de hamster, mostraron una inhibición en el % de ovocitos penetrados (60 %, $p < 0.01$) dependiente de la dilución de anticuerpo utilizada. Esta inhibición no se debió a un efecto de anti-ARP sobre la viabilidad ni la motilidad de los ES, analizada objetivamente por CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Ovocitos descartados de programas de FIV (n=95), incubados con proteína ARP recombinante y sometidos a IFI, presentaron marca en forma de agregados en toda su superficie. En contraste, los ovocitos incubados bajo condiciones controles (proteínas, anticuerpos y combinaciones de proteínas y sus anticuerpos) no presentaron marcación, indicando la existencia de sitios específicos de unión para ARP en el ovocito humano. En su conjunto, los resultados obtenidos apoyan fuertemente la participación de ARP y sus sitios de unión en el proceso de fusión de gametas humanas.

124. Estudio de la participación de la proteína testicular TPX1 en el proceso de fertilización. Dolores Busso¹, Diego A. Ellerman¹, Vanina G. Da Ros¹, Mauro M. Morgenfeld¹, Masaru Hayashi², Patricia S. Cuasnicú¹.

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental, Bs. As, Argentina. ²Universidad de Hokkaido, Sapporo, Japón. dbusso@dna.uba.ar

La proteína TPX1, altamente conservada en mamíferos, se sintetiza específicamente en el testículo y pertenece a la familia CRISP (Cysteine Rich Secretory Proteins). Junto con su homólogo epididimario DE, constituyen los dos únicos miembros con expresión en el sistema reproductor. El objetivo de este

trabajo fue estudiar la participación de la proteína testicular TPX1 en el proceso de fertilización. Estudios de inmunofluorescencia indirecta (IFI) indicaron que TPX1 se localizaría en la región acrosomal de la cabeza del espermatozoide humano. Ensayos de IFI y Western Blot revelaron que la proteína permanece sobre el espermatozoide aún luego de la reacción acrosomal, requisito esencial para un posterior rol en fertilización. La proteína recombinante (TPX1-rec) fue luego expresada y utilizada en ensayos de fusión *in vitro*. La presencia de TPX1, durante la co-incubación de gametas, inhibió significativamente el porcentaje de penetración (TPX1: 35% vs. Ctrl: 69%; $p=0,05$). Ensayos de IFI sobre ovocitos de rata sin zona pellúcida expuestos a TPX1rec, mostraron una marcación específica para la proteína sobre la superficie de los mismos. En conclusión, los resultados descriptos apoyan la participación de TPX1 en el proceso de fusión de gametas a través de sitios de unión en la membrana plasmática del ovocito.

125. La PGF2a inhibe la síntesis de NO en el útero de rata estrogenizada. Participación de la ciclooxigenasa inducible (COX-II). María Ribeiro, Mariana Farina, Ana Franchi.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET) marialauraribeiro@tutopia.com

La interacción entre las vías de las prostaglandinas (pgs) y el óxido nítrico (NO) podría estar jugando un rol fundamental en el mantenimiento de la preñez y el desencadenamiento del parto a término. El objetivo es estudiar la interrelación entre las vías del NO y las pgs en el útero de rata estrogenizada. Ratas estrogenizadas se inyectan *in vivo* con LPS solo o con inhibidores selectivos de las vías del NO y las pgs. El NO se cuantifica por la técnica de Brecht&Snyder modificada y las pgs por radioconversión. El LPS aumenta la síntesis de NO (2510 ± 122 cpm/100mg ph) y la producción de PGF2a ($0.4\pm 0.1\%$ cpm en placa/100 mg ph) y PGE2 (0.8 ± 0.1) con respecto al control (1406 ± 48 , 0.2 ± 0.03 , 0.4 ± 0.05 respectivamente). La aminoguanidina (inhibidor de la iNOS) y el meloxicam revierten el efecto del LPS sobre la síntesis de pgs, sugiriendo la participación de la iNOS y de la COX-II. El meloxicam y el nimesulide, inhibidores específicos de la COX-II, potencian el efecto del LPS sobre la síntesis de NO (3229 ± 189 , 4462 ± 638). A su vez la PGF2a en concentraciones de 10^{-8} a 10^{-10} M inhiben la acción estimuladora del LPS sobre la producción de NO. Estos resultados sugieren que las pgs sintetizadas a partir de la isoforma inducible de la COX ejercerían un efecto inhibitorio sobre la síntesis de NO en el modelo estudiado.

126. Apoptosis y proliferación celular en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis. Gabriela Meresman, Rosa I Barañao, Susana Vighi, Nidia Gómez Rueda, Ricardo Buquet, Oscar Contreras Ortiz, Marta Tesone.

Instituto de Biología y Medicina Experimental-Conicet, Departamentos de Ginecología y Patología Ginecológica, Hospital de Clínicas-UBA, Buenos Aires. (meresman@dna.uba.ar)

Es objetivo de este trabajo investigar una posible predisposición de las células endometriales de pacientes con endometriosis (EDT) a crecer en un sitio ectópico. Se evaluó apoptosis por la técnica de TUNEL y expresión proteica de Bax, Bcl-2 y Ki-67, por inmunocitoquímica, en cortes de tejido endometrial eutópico provenientes de 14 mujeres con EDT y de 16 controles infértiles (C). Se observó una disminución de cél. apoptóticas/campo (CA) en el tejido endometrial de pacientes con EDT ($p<0.001$), que se conservó a lo largo del ciclo menstrual. En la fase proliferativa tardía (FP), los niveles de apoptosis fueron de: 7.08 ± 0.92 CA en C vs 1.9 ± 0.73 CA en EDT ($p<0.05$); y en la fase secretoria tardía (FS), 11.6 ± 1.74 CA en los C vs 2.7 ± 0.82 CA en EDT ($p<0.001$). Se halló

incrementada la expresión de Bcl-2 en la FP en el endometrio de pacientes con EDT. La expresión de Bax aumentó en la FS tanto en muestras de pacientes como de C, ausentándose durante la FP. Se observó un aumento de proliferación celular (Ki-67) en el endometrio de las pacientes con EDT tanto en la fracción estromal ($p<0.05$) como en el epitelio glandular ($p<0.05$). Las células endometriales de pacientes con EDT poseen características apoptóticas y proliferativas alteradas que las harían más susceptibles a crecer en un sitio ectópico. Bcl-2 estaría implicado en la protección de la apoptosis durante la FP, mientras que Bax estaría involucrado en la regulación de este proceso previo a la menstruación.

127. Participación de la proteína espermática P66 en la unión espermatozoide-zona pellúcida humana.

Andrea Lasserre, Carolina Moules, Fernanda Gonzalez Echeverría, Jorge Tezón, Patricia Miranda, Mónica Vazquez-Levin.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. CONICET-UBA. Fertilab, Buenos Aires. (mhvaz@dna.uba.ar)

La interacción entre las gametas es mediada por proteínas de la superficie de la cabeza del espermatozoide y de la matriz extracelular del ovocito, la zona pellúcida (ZP). El presente trabajo tuvo como objetivo la identificación de antígenos espermáticos de superficie involucrados en el reconocimiento de la ZP. Se obtuvo un extracto de proteínas espermáticas por tratamiento con un buffer con alta fuerza iónica (NaCl 1 M)(HSE, High Salt Extract). Se desarrollaron anticuerpos policlonales (anti-HSE) que reconocieron numerosas proteínas en HSE (9-200 kDa). Luego se obtuvieron anticuerpos contra dos polipéptidos mayoritarios de 66 (p66) y 49 (p49) kDa. Ambos anticuerpos (anti-p49 y anti p66) reaccionaron con la cabeza y la cola de espermatozoides eyaculados y capacitados. En ensayos de Western blot con anti-p66 se detectó una señal específica para p66 en testículo y en epidídimo y para p49 en plasma seminal. En ensayos de unión a hemizona (HZ) anti-p49 +anti-p66 (100 ug/ml) inhibieron la unión de los zooides (6 ± 2 vs. control: 10 ± 3 , $p<0.01$). La presencia de p66 (10ug/ml) durante el ensayo de HZ produjo una disminución en el número de espermatozoides unidos/HZ (9 ± 3 vs. control: 22 ± 3 , $p<0.01$). P49 no tuvo efecto sobre la interacción entre las gametas. Los resultados sugieren la participación de p66 en el proceso de interacción espermatozoide-ZP humana.

METABOLISMO I

128. Análisis del metabolismo de alfa-2-macroglobulina (A2M) utilizando monofluorofosfato de sodio (MFP) en ratas y seres humanos. Alfredo Rigalli; María Aguirre; Mirta Armendariz; Rodolfo Puche.

Area Matemática, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y Cátedra de Química Biológica, Facultad de Cs. Médicas, U. N. Rosario. e-mail: arigalli@fmedic.unr.edu.ar

La A2M es una antiproteasa normal del suero. El control de la concentración plasmática es desconocido. El MFP inhibe la A2M y es un instrumento apto para investigar el control metabólico de esta proteína, en la rata y en seres humanos. El modelo matemático de la homeostasis se tradujo en un sistema de ecuaciones diferenciales lineales, que predice las concentraciones de A2M, MFP-A2M en plasma y MFP en el plasma y en el tubo digestivo, así como las velocidades de captación de A2M-MFP (kc), de eliminación del MFP del plasma (ke), de secreción de A2M al plasma (ks) y absorción intestinal de MFP (ka). Seis ratas IIM/FcM, recibieron *i.v.* 1 umol de MFP y se determinó A2M y A2M-MFP en plasma. Se obtuvieron los valores de $kc=0.061\pm 0.059$ min⁻¹ (*); $ki=0.016\pm 0.009$ min⁻¹ (#); $ks=0.152\pm 0.044$ min⁻¹ (#), $ke=0.151\pm 0.043$ (#). * y #: difieren significativamente de cero $p<0.05$ y 0.01, respectivamente. Un desarrollo similar se llevó a cabo para seres humanos, considerando la administración de MFP por vía oral. El modelo re-

sultante permite obtener las variables indicadas mas arriba y la variación de la concentración de MFP en el tubo digestivo. Los modelos matemáticos desarrollados permiten predecir las concentraciones plasmáticas de A2M, MFP-A2M y MFP en seres humanos y en la rata así como las constantes de velocidad de los procesos involucrados en el control de la concentración plasmática de A2M

129. Evaluación de VLDL como sustrato de lipoproteína lipasa (LPL) in vitro. Gabriela Berg, Laura Schreier, Valeria Zago, Ana I. Gonzalez, Regina Wikinski.

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
e-mail: gaberg@dbc.ffyb.uba.ar

Alteraciones en la composición química de VLDL condicionarían su comportamiento catabólico frente a la LPL. El objetivo de este trabajo fue evaluar la función de VLDL como sustrato *in vitro* de LPL en relación con sus componentes. Se aisló VLDL de 20 donantes con triglicéridos (TG) plasmáticos entre 0.53 y 7.56 mmol/l. Se incubó con LPL bovina en solución, se midieron ácidos grasos liberados calculando la constante de afinidad (Km) por análisis de Lineweaver-Burk, se determinaron en VLDL colesterol (col), TG, fosfolípidos y proteínas (P) % y los cocientes TG/P y col/TG. Se obtuvo correlación directa entre Km y col% así como con col/TG: $r=0.64$ y 0.61 , $p<0.01$ respectivamente. Utilizando el valor de corte 0.20 para col/TG, se definieron 2 grupos: A ($n=12$) media \pm SD, 0.17 ± 0.03 y B ($n=8$) 0.26 ± 0.07 , $p<0.001$. El grupo A mostró menor Km: 1.6 ± 0.9 $\mu\text{molTG/ml}$ que B: 4.3 ± 1.3 , $p<0.001$. Col-VLDL fue mayor en B ($13.9\pm 2.7\%$) que A (10.0 ± 2.3), $p<0.004$. El resto de los parámetros de VLDL no difirió. Las VLDL con mayor contenido en colesterol, caracterizadas como VLDL atípicas, presentaron mayor Km y por lo tanto menor afinidad enzimática.

130. Cuantificación de la masa muscular, evaluación y diagnóstico nutricional específico en enfermedades neuro-musculares. Modelo en distrofia muscular de Duchenne (DMD). Pessolano FA, Suarez A, Monteiro S, Dubrovsky A, Mesa L, De Vito EL.

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, UBA, Bs. As. Argentina.

En la DMD la composición corporal se encuentra alterada por pérdida de masa muscular, pseudo-hipertrofia y redistribución hídrica. Esto dificulta la valoración del estado nutricional por adecuación peso/talla, pliegue cutáneo, bioimpedancia, etc. Su relación con parámetros de fuerza muscular no ha sido analizada. **Objetivos:** 1) Evaluar el estado nutricional, 2) Relacionar la masa muscular corporal (MMC) con la edad, 3) Correlacionar la MMC, con la clase funcional motora (CFM, Vignos 63) y la fuerza muscular respiratoria (Pimax). **Material y Métodos:** $n = 34$ (15 ± 5 a). Índice Creatinina - Talla. Creatinuria teórica normal (Graystone 68). MMC (kg) (Griffiths 88). Peso libre de músculo (PLM) = peso corporal total - MMC. Porcentaje de adecuación = PLM hallado / PLM teórico%. **Resultados:** 1) Estado nutricional según PLM: Enutrición: 6%, Bajo Peso: 6%, Sobrepeso 88%. Según peso / talla: 21%, 23% y 56% respectivamente. 2) MMC% : 31 ± 19 . 3) La MMC% correlacionó con edad, CFM, Pimax, Pemax, CVF (ml), $p < 0.01$. **Conclusiones:** DMD presenta una severa pérdida de la MMC con la edad. La consideración del compartimiento muscular cambia sustancialmente el diagnóstico de estado nutricional. La fuerza periférica (CFM) y respiratoria (Pimax, Pemax) disminuye cuando cae la MMC. Para igual MMC, la fuerza de los músculos respiratorios se halla más preservada que la periférica.

131. Biosíntesis de Porfirinas en Trypanosoma cruzi. Elisa Lombardo, Lidia Araujo, Alejandra Ciccarelli y Alcira Battle.

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias.

CONICET. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
e-mail: lombardo@bc.fcen.uba.ar

El *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas. Conocida la incapacidad de reproducción del mismo, *in vitro*, si no se le suministran compuestos hémicos, nuestro objetivo es dilucidar las causas de esta deficiencia. Determinando el contenido de metabolitos y de la actividad de las enzimas involucradas en esta ruta metabólica observamos que a pesar de no poder sintetizar *in vitro* ni acumular intracelularmente cantidades significativas de ácido 5-aminolevulínico (ALA), porfobilinógeno, porfirinas y hemo, si se observan grandes cantidades de ALA extracelularmente ($153,34\pm 7,56$ nmoles/mg). El ALA se identificó por formación de derivados y detección espectrofotométrica. En cuanto a la síntesis de ALA, no se detectó *in vitro* actividad de ALA-sintetasa (ALA-S) pero sí la presencia de un componente de bajo peso molecular, no proteico e inestable al calor, capaz de inhibir (hasta un 60%) la actividad *in vitro* del ALA-S de *Rhodobacter spheroides*. La inhibición no puede atribuirse a ALA, ácido 4,5-dioxivalérico (DOVA) o hemo libre, el inhibidor tampoco sería un metabolito que se origine en el proceso de incubación. La actividad de la DOVA-transaminasa, que también forma ALA *in vitro* fue de $7,13\pm 0,49$ UE/mg. Dada la falta de especificidad de ésta última, postulamos al ALA-S como la enzima responsable de la síntesis del ALA, estando inicialmente sujeta a inducción por falta de hemo y posteriormente a inhibición

132. Enzimas tónicas y calidad proteica*. Susana Feliu, Lucrecia Caran Missart, Nora Slobodianik.

Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. e-mail: msfeliu@ffyb.uba.ar

Se estudia el efecto de la administración de dieta con proteína de maíz (M) o caseína (Cas) sobre la actividad de: Adenosina deaminasa (ADA), Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP) y 5'Nucleotidasa (5'NT) en timo de ratas al destete. Ratas bien nutridas durante la lactancia recibieron al destete y durante 18 días las dietas experimentales (6,5% de proteína) (grupos M y Cas). El lote control de igual edad, recibió dieta stock (C). Al final de la experiencia los animales fueron pesados, extrayéndoseles el timo que fue pesado; se prepararon suspensiones celulares. Se determinó la actividad de las enzimas ADA y PNP (μmol de ácido úrico $\times 10^{-1}/\text{P}$) (técnica de Wu & Marliss modificada) y 5'NT (UI/órgano/P) (técnica Wiener); $\text{P} = \text{Peso timo (mg)} / \text{Peso corporal}^{0.75}$ (g). Los resultados fueron ($\#p<0.01$):

GRUPO	ADA	PNP	5'NT
M	25.0 \pm 6.4#	7.2 \pm 1.2#	2.7 \pm 0.2
Cas	16.8 \pm 3.5#	3.4 \pm 0.9	2.3 \pm 0.5
C	9.8 \pm 1.5	4.3 \pm 1.5	2.6 \pm 0.8

Se observa que la administración de una dieta con proteína de maíz (bajo valor biológico) a ratas bien nutridas aumenta la actividad de ADA y PNP; la dieta con caseína (alto valor biológico) sólo aumenta la actividad de ADA. No se observan diferencias significativas en la actividad de 5'NT para ambas dietas. * Financiado por Ubacyt TB077 y Lab. Wiener.

133. Marcadores de estrés oxidativo en ratas diabéticas y con hipertensión portal. Llesuy Susana, Polo José, Faure Albanese Trinidad, Evelson Pablo, Rodriguez Ricardo, Berra Mariel, Filinger Ester, Ruibal Andrea, Scorticati Camila, Perazzo Juan, Lemberg Abraham.

Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.
e-mail: sllesuy@huemul.ffyb.uba.ar

La diabetes crónica es una afección común como así también la hipertensión portal que surge de hepatopatías crónicas

severas en seres humanos las cuales se relacionan con el daño oxidativo. El objetivo es evaluar los marcadores de daño oxidativo en el hígado de ratas sometidas a ambas patologías simultáneamente. Se trabajó con ratas Wistar de 300g de peso que se dividieron en 5 grupos: 1 control, 2 sham, 3 hipertensas, 4 diabéticas, 5 diabéticas + hipertensas. Las animales recibieron streptozotocina (70 mg/ kg) durante 3 meses, 14 días antes del sacrificio se les generó hipertensión portal. El hígado fue extraído para determinar la actividad de la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX). Los resultados muestran, que la GPX de los animales del G4, G3, G5 esta disminuida en un 32%, 36% y 42% respectivamente, todos los valores comparados con el G1: 43 ± 5 mU/mg prot). No se registraron cambios entre el G1 y 2. La SOD no muestra diferencias entre los animales controles y los diabéticos, pero si lo hace cuando con el grupo hipertensos y con el G5 en los que disminuyeron en un 60% y un 53% respectivamente (G1: $3,5 \pm 0,4$ U/mg prot). Con referencia a la catalasa, esta se encuentra disminuida en el G4 (67%) y en el G5 (56%; G1: $7,6 \pm 1,5$ pmol/mg prot), pero no así en el G3. Los resultados sugieren que las enzimas antioxidantes son buenos marcadores de daño oxidativo en la evolución de las patologías.

134. Caracterización de las alteraciones producidas por una mutación en el gen de la Uroporfirinógeno decarboxilasa. (URO-D) Lidia Araujo, Elisa Lombardo, Silvia Matiacevich y Alcira Battlle.

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias. CONICET. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
e-mail: lombardo@qb.fcen.uba

En la porfiria cutánea tardía y hepatoeritropoyética, la actividad de URO-D está disminuida. Esta enzima cataliza la decarboxilación secuencial de cuatro grupos carboxilo del Uroporfirinógeno para formar Coproporfirinógeno. El mecanismo de acción de esta enzima aún no se conoce. Empleamos como fuente experimental dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, una salvaje D273-10B y su mutante B231 deficiente en URO-D. Una vez puesto a punto un método para aislar RNA de levaduras, y mediante la técnica de RT-PCR amplificamos y secuenciamos el gen de la URO-D. La mutante mostró sólo una modificación en el codón 59 (TCT TTT) que produce un cambio de serina por fenilalanina, localizado en una región de altamente conservada, con una conformación de hélice importante para mantener la integridad del sitio activo. La caracterización bioquímica de la URO-D en ambas cepas, demostró que *in vivo* la B231 muestra una acumulación de Uro III (55-56%), hepta (20-25%), hexa (12-18%) y pentaporfirina (5-7%) respecto a la cepa salvaje, indicando una deficiencia importante, principalmente en la última etapa de decarboxilación. En cambio cuando la actividad de la B231 se midió *in vitro* la etapa favorecida fue la primera decarboxilación, 42-46% de hepta; 20-25% de hexa, 18-20% de penta y 10-12% de copro. La diferencia de comportamiento para la URO-D de la cepa B231 medida *in vivo* e *in vitro* se atribuye a una distinta disponibilidad de sustrato y/o a la participación de los isómeros de las distintas porfirinas involucradas.

135. Efecto del nivel de calcio de la dieta durante gestación y lactancia sobre el zinc en sangre y en hueso, en ratas. Adriana Weisstaub¹, Susana Zeni², Silvana Di Gregorio², Patricia Ronayne de Ferrer¹ y María Luz Pita Martín de Portela¹.

²Sección Osteopatías, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires. ¹Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
e-mail: mportela@ffyb.uba.ar

La existencia de interrelaciones entre el calcio (Ca) y zinc (Zn) de la dieta podría afectar la utilización y movilización del Zn durante gestación y lactancia. Por ello, se estudió la in-

fluencia del nivel de Ca de la dieta, durante preñez y lactancia, sobre el contenido materno de Zn en hueso y en sangre. Ratas Wistar, hembras, peso: 280 a 350 g, se alimentaron desde el comienzo de la preñez (To) hasta el final de la lactancia (Tf) con una dieta conteniendo/100 g: proteínas: 20g; Zn: 7 mg; fósforo: 0.7g; Ca: variable: 0.14, 0.6 ó 0.9g (grupos GB, GN y GA, respectivamente). A To, en un grupo control, y a Tf se determinó Zn (Espectrometría de Absorción Atómica) en sangre entera (ZnS) y en fémur (ZnF). Los promedios \pm DE fueron: ZnS (ug/dL): To: 470 ± 51 ; Tf: GB: 1290 ± 451 ; GN: 373 ± 74 ; GA: 385 ± 61 . ZnF (ug/100 mg): To: 24.3 ± 2.4 ; Tf: GB: 30.2 ± 1.9 ; GN: 24.1 ± 0.6 ; GA: 24.1 ± 1.9 . ZnS entre To y Tf aumentó en GB ($p<0.001$); disminuyó ($p<0.01$) en GN y GA; no mostró diferencias entre GN y GA. ZnF no mostró diferencias entre To y Tf para GN y GA, pero aumentó en GB ($p<0.001$). Estos resultados evidencian que: 1) el bajo aporte de calcio, con Zn constante, afecta la utilización del Zn; 2) no existió efecto negativo al incrementar en 50% el nivel de Ca aconsejado para ratas durante gestación y lactancia. **Este trabajo es parte de la Tesis Doctoral de la Bioquímica Adriana Weisstaub. Programación UBA, AB26 y TB060.**

SISTEMA CARDIOVASCULAR II

136. Efectos del ayuno sobre la contractilidad del corazón de rata sometido a isquemia-reperusión. Gabriela Marina Prendes, Gustavo Testoni, Christian Astudilla, Paula Kade, Alicia Varela, Enrique Savino.

Cátedra de Fisiología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, IQUIMEFA-CONICET.
e-mail: gmarina@huemul.ffyb.uba.ar

El objetivo fue investigar los efectos del ayuno, que acelera la oxidación de los ácidos grasos endógenos, sobre la contractilidad del corazón sometido a isquemia global. Se trabajó con corazón perfundido Langendorff proveniente de ratas alimentadas (Al) (n=8) o ayunadas 24 h (Ay) (n=8). Luego de 25 min de estabilización el corazón fue sometido a 25 min de isquemia global (I) seguidos de 30 min de reperusión (RP). La contractilidad se evaluó mediante la presión desarrollada (PD), las derivadas de la contracción (+dP/dT max) y relajación (-dP/dT max) y la presión diastólica final (PDF). Para el análisis estadístico se aplicó ANOVA y el test de Tukey. La PDF fue menor en Ay ($16,88 \pm 4,7\%$ vs $40,28 \pm 9,90\%$ a los 25 min de I, $p<0,05$). El ayuno aceleró la recuperación postisquémica, PD: $71,13 \pm 17,58\%$ vs $25,45 \pm 5,63\%$, $p<0,01$, +dP/dT max: $113,2 \pm 17,01\%$ vs $35 \pm 4\%$, $p<0,01$, -dP/dTmax: $81 \pm 13\%$ vs $43,8 \pm 6,22\%$, $p<0,01$ a los 10 min de RP. La recuperación de la frecuencia espontánea fue similar en ambos grupos. La liberación de lactato durante los primeros 5 min de RP fue menor en el grupo de ayunadas: 109 ± 11 vs 172 ± 13 umol/gh, $p<0,01$. Los resultados indican que en este modelo experimental, el ayuno atenúa la disfunción contráctil isquémica y mejora la recuperación post-isquémica. Dicho efecto podría deberse, al menos en parte, a la reducción del efecto nocivo de la acumulación de lactato en isquemia.

137. Contribución de un cotransportador Na⁺/HCO₃⁻ electrogénico a la configuración del potencial de acción cardíaco. Celeste Villa-Abrille, Alejandro Aiello, Horacio Cingolani.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

En el presente trabajo nos propusimos investigar la contribución del cotransporte electrogénico $1\text{Na}^+/2\text{HCO}_3^-$ (n=2) a la configuración del potencial de acción (PA) de miocitos ventriculares de gato. Para ello se utilizó la configuración de patch-perforado de la técnica de patch-clamp en combinación

con registros simultáneos de acortamiento celular (AC). El cambio de una solución que no contenía HCO_3^- (HEPES buffer) por otra que contenía el buffer fisiológico (HCO_3^- 20 mM) produjo un progresivo acortamiento de la duración del PA acompañado por una disminución inicial transitoria y una recuperación posterior del AC. Al cabo de 8-10 minutos de exposición a HCO_3^- , el AC se estableció en un valor $23 \pm 4\%$ mayor que en HEPES, mientras que la duración del PA medida al 50% (APD_{50}) y 90% (APD_{90}) de la repolarización se redujo un $34 \pm 8\%$ y $26 \pm 7\%$, respectivamente ($n=6$, $p<0.05$). No se detectaron cambios en la corriente de Ca^{2+} tipo L (I_{Ca}) luego del cambio de HEPES a HCO_3^- , indicando que la reducción sostenida del APD y transitoria del AC no se debe a una disminución en I_{Ca} . Por otra parte, el acortamiento del APD inducido por HCO_3^- fue prevenido y revertido por el bloqueante de los transportadores aniónicos, SITS (1 mM). El reemplazo total de Na^+ extracelular por Li^+ inhibió el acortamiento del APD inducido por HCO_3^- . En conjunto, estos resultados indican que el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ($n=2$) se presenta como un importante modulador de la configuración del PA cardíaco.

138. Actividad paraoxonasa en hipertrigliceridemia primaria. Julián Verona, Fernando Brites, Graciela Castro, Regina Wikinski.

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A. e-mail: fbrites@dbc.fyb.uba.ar.

La enzima paraoxonasa (PON) es transportada por las HDL e inhibe la oxidación de las LDL. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad de PON en hipertrigliceridemia (HTG) primaria, cuya relación con la aterosclerosis es aún controvertida. Se estudió un grupo de pacientes con HTG (TG > 200 mg/dl) y bajo colesterol-HDL (C-HDL < 35 mg/dl) ($n=12$) en comparación con individuos normotrigliceridémicos (NTG) con ($n=12$) o sin ($n=12$) bajo C-HDL. El perfil de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas fue evaluado empleando métodos estandarizados. La actividad paraoxonasa fue medida utilizando dos sustratos diferentes: paraoxón con o sin NaCl 1M (actividades PON 1M y PON) y fenilacetato (actividad arilesterasa, ARE). Las actividades PON, PON 1M y ARE se hallaban significativamente disminuidas sólo en los pacientes con HTG y bajo C-HDL con respecto a los sujetos NTG con C-HDL normal (PON=166±63 vs 247±69 nmol/ml.min., $p<0,01$; PON 1M=201±115 vs 376±180 nmol/ml.min., $p<0,05$; ARE=760±199 vs 950±216 umol/ml.min., $p<0,01$; respectivamente). Todas las actividades mostraron correlaciones positivas y significativas con los niveles de C-HDL, C-HDL₂, C-HDL₃, apo A-I y LpA-I:A-II. La capacidad antiaterogénica de la HDL no sólo está limitada a su función en el transporte inverso del colesterol, sino también a su potencial antioxidante, principalmente atribuido a la PON. En pacientes con HTG primaria y bajo C-HDL, la baja actividad PON podría estar contribuyendo a la asociación entre hipertrigliceridemia y aterosclerosis.

139. La reabsorción proximal de Na está asociada con la variante 235T del gen del angiotensinógeno en hijos de hipertensos. Rosa Simsolo, Beatriz Grunfeld, Patricia Porto, Miriam Romo, Laura Rabinovich, Mariela Bonanno, Silvia García, Carlos Pirola.

Hosp. Niños. Gutierrez, Inst. A Lanari. rsimsolo@intramed.net.ar

El sistema renina-angiotensina (SRA) participa en la homeostasis del agua y Na y en la regulación de la presión arterial. Variantes moleculares de los genes que forman parte del sistema se consideran factores de riesgo de hipertensión. Previamente reportamos un aumento de la reabsorción renal proximal de sodio evaluado por clearance de litio (CLI) en hijos de hipertensos (HH). El objetivo del presente trabajo fue buscar asociaciones entre las variantes polimórficas de genes del SRA y el CLI como fenotipo cuantitativo. Se genotipificaron 52 HH para el angiotensinógeno (variantes M235T y T174M), el

gen de la ECA (polimorfismo I/D) y el gen del receptor tipo 1 de angiotensina II (A1166C) por PCR y RFLP o ASO. Los HH fueron divididos de acuerdo al CLI ($p<0.000$): disminuido CLiD: 12.5 ± 0.4 ml/m ($n=23$, 12.9 ± 0.5 a., 15 v.) y normal CLiN: 25.5 ± 2.2 ml/m ($n=29$, 14.3 ± 0.3 a., 16 v.). Se analizaron los efectos de los polimorfismos en el CLI por regresión logística, luego de ajustar por BMI y clearance de creatinina. Se obtuvo un OR de 3.8 ($p<0.008$) para el M235T (95% IC 1.4 a 10.3). No hubo asociaciones con los otros genotipos. En conclusión, la variante M235T del angiotensinógeno estaría relacionada a la reabsorción proximal de sodio en hijos de hipertensos.

140. Aplicaciones clínicas del contenido de ácido siálico de LDL aislada. Adriana Scoccia, María Molinuevo.

Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. e-mail: ascoccia@biol.unlp.edu.ar

Se ha propuesto que una disminución en el nivel de ácido siálico (AS) en partículas de LDL puede jugar un rol en aterogenicidad. El objetivo de este estudio es evaluar un método, apto para el laboratorio clínico general, que permita establecer el contenido de ácido siálico de partículas de LDL aisladas por métodos de precipitación selectiva y establecer relaciones entre parámetros de utilidad clínica. La LDL se aisló por un método de precipitación selectiva mediante sulfato de polivinilo disuelto en polietilenglicol; la determinación de ácido siálico se realizó por hidrólisis ácida, reacción con periodato y colorimetría con ácido tiobarbitúrico. Los resultados obtenidos para sujetos normales (35 a 60 años de ambos sexos) en nmol AS/mg proteína LDL fueron de 44.3 ± 3.6 (media \pm SEM, $n=12$). Estos resultados fueron concordantes con la bibliografía (40.4 ± 2.7) para LDL aislada por ultracentrifugación. En un grupo de pacientes diabéticos descompensados encontramos una media \pm SEM de 20 ± 2.8 nmol AS / mg proteína LDL. El valor teórico máximo estimado es de 24 mol AS / mol apoB, siendo nuestros resultados de 18.9 ± 1.5 en la población normal. El método desarrollado es accesible al laboratorio clínico y puede aplicarse para explorar el riesgo aterogénico a través de esta modificación de las partículas de LDL.

141. Protección con enalapril (E) del hígado graso y dislipemia asociadas al envejecimiento de la rata.

Felipe Inserra¹, León Ferder¹, Jorge Toblli², Marisa Giménez¹, Nora Paglia¹, Nidia Basso¹.

¹Instituto de Investigaciones Cardiológicas - Universidad de Buenos Aires - CONICET. ²Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán, Buenos Aires. (expneph@fibertel.com.ar)

Se evaluó el efecto del E administrado desde el destete durante 7 o 18 meses en los cambios hepáticos y del colesterol y triglicéridos debidos a la edad. Ratas Wistar macho ($n=34$) en 2 grupos: Control (C) y E: 10 mg/kg/día en el agua de bebida. A los 7 meses 10 C y 10 E fueron sacrificadas; el resto a los 18 meses. Se evaluó en plasma: colesterol (mg/dl), triglicéridos (mg/dl) y TGO, TGP y fosfatasa alcalina (FA, UI/l). Cortes de hígado se tiñeron con H&E, tricrómico de Masson y Red-Oil O. El % de hígado graso (HG) se determinó por MO a 100X en 20 campos ópticos en cada animal.

	7 meses		18 meses	
	C (n=10)	E (n=10)	C (n=7)	E (n=7)
Colest.	89.3±23.2	72.1±17.9	216.2±37.7	83.2±4.8#
Triglic	109.5±41.2	70.3±19.1*	279.1±19.5	76.6±11.8#
TGO	62.1±25.3	63.6±38.6	184.8±26.0	63.7±14.4#
TGP	26.9±10.3	33.5±18.3	121.5±24.6	67.4±13.3#
FA	133.2±41.4	155.0±46.6	234.5±35.7	170.8±24.1#
% HG	2.8±1.1	0.4±0.4#	22.1±15.2	4.2±1.9#

* $p<0.01$ vs. C; # $p<0.005$ vs. C

En los animales control de 18 meses se observó una correlación positiva entre % HG y colesterol, triglicéridos y enzimas hepáticas. Conclusiones: Los resultados indican que en la rata Wistar normal el Enalapril: 1.- produce un efecto protector sobre el desarrollo de HG y sobre la función hepática; 2.- disminuye el nivel de colesterol y triglicéridos en plasma.

TRANSDUCCION DE SEÑALES I

- 142. Fosforilación/defosforilación de la Na-K-ATPasa en Asa Gruesa medular ascendente de Henle (mTAL) en ratas controles (C) y en Insuficiencia renal crónica (IRC).** Claudia Bertuccio, Jorge Toledo, Elvira Arrizurieta, Rodolfo Martín, Fernando Ibarra.

Laboratorio de Nefrología Experimental, Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari, UBA (ilanari@pinos.com).

Estudios previos han demostrado que la Na-K-ATPasa del túbulo proximal está regulada por la acción de PKC y calcineurina, -que disminuye o aumenta su actividad, respectivamente- y que la mayor actividad se asocia a menor defosforilación. El objetivo de este trabajo fue extender esos estudios mTAL microdisecadas, en C y IRC, donde previamente hemos observado un aumento de la expresión y actividad de la Na-K-ATPasa en IRC. Se microdisecaron entre 8-9 mm de mTAL, que fueron incubadas 10 min con inhibidores de la PKC, Ro-318220, 10^{-6} M (Ro) y de la calcineurina, FK-506 10^{-6} M (FK). Luego se efectuó Western-blot utilizando McK1, un anticuerpo monoclonal dirigido contra la Serina 23 de la subunidad α -1 en estado defosforilado, uno de los sitios de acción de PKC. Las membranas de nitrocelulosa fueron teñidas con Amido Black para asegurar una cantidad homogénea de proteínas. El inmunoblot de la Na-K-ATPasa mostró un aumento en la densidad óptica en mTAL tratadas con Ro, en C (8.9 ± 0.1 D.O. vs. Ro: 11.6 ± 0.9 D.O.) y en IRC (3.2 y 3.1 vs. Ro: 7.5 y 6.8). La FK disminuyó la D.O. en C (10.3 ± 0.06 vs. FK: 8.7 ± 0.08 , $P < 0.05$) y en IRC (5.7 ± 0.3 vs. FK 4.5 ± 0.1 , $P < 0.05$). Los datos sugieren que el estado de fosforilación/defosforilación de la Na-K-ATPasa en la mTAL también es regulado por la acción antagónica de mensajeros intracelulares como PKC y calcineurina, tanto en ratas controles como en IRC.

- 143. Vía de MAP quinasa MEK en la regulación de Nur77 y Nurr1 por CRH y AMPc en células corticotrofas AtT-20.** Damián Kovalovsky, Eduardo Arzt.

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA. CONICET. e-mail: earzt@bg.fcen.uba.ar

CRH estimula al gen de proopiomelanocortina (POMC) en células corticotrofas vía los factores de transcripción Nur77 y Nurr1 que reconocen el sitio NurRE en el promotor. Previamente observamos que el factor liberador de adenocorticotrofina (CRH) y AMPc estimulan la actividad NurRE. Para analizar en detalle las vías involucradas, mediante tranfecciones con un vector NurRE-LUC analizamos la actividad transcripcional y por Northern-blot la modulación del RNAm de Nur77 y Nurr1. PD98059 (50 μ M), un inhibidor de MEK, inhibe (50%) la estimulación de NurRE por CRH (100 nM) y AMPc (500 μ M), pero solo inhibe (50%) la estimulación del mRNA de Nur77 por AMPc. PD98059 inhibe (50%) la estimulación del promotor de POMC por CRH y AMPc. Usando las construcciones GAL4-ELK1 y GAL4-LUC observamos que CRH y AMPc estimulan (300%) la vía MAP quinasa (MAPK) ERK1/2. Un dominante negativo de Rap1b (Rap1b N17), inhibe esta estimulación. Demostramos la expresión del mRNA de B-Raf (0,5 kb). Concluimos que la vía de MAPK (Rap1b->B-Raf->MEK) es funcional en corticotrofos y está involucrada en la estimulación de POMC y Nur77/Nurr1 por CRH y AMPc.

- 144. La Heregulina (HRG) activa transcripcionalmente al receptor de progesterona (PR) en células**

progéstgeno-dependientes (HD) de carcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA). Leticia Labriola, Mariana Salatino, Federico Movsichoff, Omar Coso, Adali Pecci, Alberto Korbliht, Eduardo Charreau, Patricia Elizalde.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. elizalde@dna.uba.ar

Demostramos previamente que la HRG estimula la unión del PR a un elemento respondedor a progesterona (PRE) en células HD de carcinomas mamarios inducidos MPA (Medicina 59:576,1999). Estudiamos ahora el rol de ErbB-2, co-receptor de HRG, y de las MAPK en la proliferación mediada por HRG. El tratamiento de células HD con oligodeoxinucleótidos antisentido (ASODNs) al ErbB-2 (2 μ M) inhibió significativamente ($p < 0.001$) la proliferación mediada por HRG (20 ng/ml). El inhibidor específico de MEK-1, PD98059 (10 μ M), resultó también en el bloqueo de la proliferación inducida por HRG (Incorporación de (3 H) timidina: control: 2814 ± 152 cpm, HRG: 4742 ± 468 cpm, HRG+ErbB2ASODN: 1611 ± 283 cpm, HRG+ErbB-2SODN: 4045 ± 432 cpm, RG+PD98059: 3385 ± 66 cpm). Ensayos de "DNA mobility shift" mostraron que en células tratadas con ErbB-2 ASODN o PD98059 la HRG no fue capaz de inducir la unión del PR al PRE. La capacidad de HRG de transactivar al PR se estudió transfectando células HD con un vector conteniendo un PRE fusionado al gen reportero de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT). HRG, aumentó significativamente ($p < 0.001$) la inducción de CAT. Este aumento es revertido cuando se tratan las células con HRG + ErbB-2 ASODN o HRG+PD98059 (Control: $16 \pm 1\%$; MPA: 100% ; HRG: $79 \pm 2\%$, HRG + ErbB-2 ASODN: $13 \pm 3\%$, HRG+ErbB-2SODN: $80 \pm 3\%$, HRG+PD98059: $12 \pm 2\%$). Concluimos que HRG activa transcripcionalmente al PR a través de un mecanismo que requiere un ErbB-2 funcional y la vía de las MAPK activa.

- 145. Caracterización de proteasas en el núcleo supraquiasmático del hamster.** M. Laura Grilli, Patricia V. Agostino, Diego A. Golombek.

Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. e-mail: dgolombek@unq.edu.ar

La regulación de algunos genes componentes del reloj circadiano es llevada a cabo mediante la degradación de proteínas en momentos específicos del día y/o en respuesta a estímulos sincronizadores del ambiente. No existe información acerca de la presencia y actividad de proteasas en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), sede del reloj de mamíferos. La actividad de proteasa fue determinada en homogenatos de NSQ de hamster (sacrificados a distintas horas del día) mediante zimografías en geles de acrilamida 9% copolimerizados con g-latina 1%, teñidos luego de la corrida electrofórica con Amido lack 0.2%. La colagenasa A (MMP 2, 72 kD) está activa en forma constitutiva, sin variación diaria; la colagenasa B (MMP 9, 92 kD) está activa en un grado menor, y presenta una mayor actividad nocturna. Esta actividad es Ca^{2+} -dependiente y fue inhibida en presencia de EDTA 25 mM. Hemos hallado actividad de tipo tripsina, con un marcado aumento durante el día, así como expresión de caspasa 8 en homogenatos de NSQ. En SDS-PAGE de proteínas de NSQ en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, leupeptina 100 μ M) notó una banda de 66 kD sustrato de actividad proteasa en forma constante, y una de 40 kD que desaparece sólo a las 12 h, sugiriendo una regulación temporal de actividad proteasa. Financiado por ANPCyT y UNQ.

- 146. Identificación de dos nuevos factores de transcripción vinculados a las MAP quinasa mediante rastreo de una biblioteca de ADN copia en levaduras.** Tamara Tanos, Federico Coluccio-Leskow, Horacio Martinetto & Omar Coso.

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. FCEN - UBA. INGEPI - CONICET. (coso@bg.fcen.uba.ar). Presentado por la Dra. E.C. Kordon.

Los componentes típicos de los mecanismos de transducción de señales que involucran cascadas de MAPKs son: pequeñas proteínas G, una sucesión de proteínas quinasas y factores de transcripción. El ejemplo más caracterizado hasta la fecha es el de la cascada Ras-Raf-MEK-Erk2-Elk-1. Una cascada paralela pero claramente distinta fosforila y activa al factor transcripcional c-Jun (JNK). Con sus características particulares, otros factores de transcripción recibirían señales a través de un mecanismo análogo. Recientemente se ha logrado clonar molecularmente nuevas MAPKs. Entre ellas se destacan p38/HOG, Erk5, Erk6 y SAPK4. Con el fin de que explorar la existencia de proteínas que, siendo capaces de interactuar físicamente con estas nuevas MAPKs, contribuyan a la regulación de su actividad o a la propagación de la señal que estas transducen, rastreamos mediante una novedosa versión del doble híbrido en levaduras, una biblioteca de ADNcopia de células HeLa. Utilizando Erk-6 como "carnada" hemos podido levantar varios clones que resisten los controles de especificidad. Análisis de las secuencias de ADN obtenidas nos permiten concluir que el factor de transcripción DJ-1 es capaz de asociarse físicamente con Erk-6 y guarda la potencialidad de ser su sustrato. Un análisis similar nos ha permitido identificar la relación entre Erk-6 y un miembro de la familia AP-1.

147. La vía de transducción de GMPc y su proteína dependiente en la sincronización fónica del reloj biológico de mamíferos. Gabriela A. Ferreyra, Alejandro Murad y Diego A. Golombek.

Departamento de Ciencia y Tecnología - Universidad Nacional de Quilmes. (dgolombek@unq.edu.ar)

La actividad de proteínas quinasas (incluyendo PKG) a nivel de los núcleos supraquiasmáticos media la respuesta de los ritmos circadianos a la luz. Los niveles de GMPc en el NSQ presentaron un ritmo diario con máximos diurnos y mínimos nocturnos, bajo condiciones de luz:oscuridad (L:O) y de oscuridad constante (O:O). Esta variación dependió de la actividad de fosfodiesterasa de GMPc (PDE) ($p < 0.0005$), pero no de guanil ciclasa (GC) ($p < 0.5$). Tanto la actividad de PKG como los niveles de su subunidad catalítica (isoforma PKG II) presentaron un ritmo con máximos valores durante el día y mínimos durante la noche tanto en L:D ($p < 0.0001$), como en D:D ($p < 0.0001$). Pulsos de luz de 5 min. (800 lux) aumentaron significativamente los niveles de GMPc a fines de la noche subjetiva (cuando se producen adelantos de fase), pero no al principio de la noche subjetiva (cuando se producen atrasos de fase) (CT18: $p < 0.03$; CT14: $p > 0.7$). Estudios *in-vivo* demostraron que el bloqueo de PKG por KT-5823 o GC por ODQ reduce significativamente el adelanto de fase como respuestas a la luz a CT18, pero no afecta la expresión de c-fos. Estos resultados sugieren que tanto la PKG como la GC estarían involucradas en la vía de transducción de señales de los cambios de fase. Financiado por ANPCyT, CONICET y UNQ.

NEFROLOGIA II

148. Enalapril (E) atenúa el stress oxidativo (OxS) en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ). Elena MV de Cavanagh¹, César G Fraga¹, Jorge Toblli², Felipe Inserra³, León Ferder³.

¹Dpto. de Fisicoquímica, Universidad de Buenos Aires; ²Hospital Alemán; ³Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Universidad de Buenos Aires. Instituto Massone. Buenos Aires. (expneph@fibertel.com.ar)

Evaluamos el efecto de E sobre OxS y la injuria en riñón (R) y corazón (C) de ratas diabéticas inducidas por STZ; divididas en: STZ (65 mg/kg, dosis única i.p.); STZ+E (STZ y E, 20 mg/L agua de beber), y Sham. A los 6 meses los órganos fueron

estudiados por M.O. Las lesiones glomerulares (LGM) y tubulointersticiales (LTI) se graduaron con score semicuantitativo (0-4). Se determinó: glucemia (mg/dl), clearance de creatinina (ClCr, ml/min) y proteinuria (mg/día). OxS: se evaluó por contenido de glutatión total (GSH, nmol/g peso fresco), sulfhidrilos asociados a proteínas (SH, nmol eq GSH/mg prot) y TBARS (nmol eq MDA/mg prot) en homogeneizados de riñón y corazón. Se utilizó ANOVA.

	STZ	STZ+E	Control
Glucemia	419.1 ± 18.9*	429.6 ± 11.5*	103.5 ± 7.5
ClCr	0.81 ± 0.01 ^o 5†#	1.17 ± 0.01	1.24 ± 0.02
Proteinuria	80.8 ± 8.5*#	24.9 ± 3.7†	8.20 ± 1.31
Score LGM	2.50 ± 0.29*#	0.75 ± 0.17	0.12 ± 0.06
Score LTI	2.41 ± 0.20*#	0.33 ± 0.21	0.16 ± 0.06
R GSH	172.8 ± 13.8†#	256.0 ± 7.7	272.5 ± 12.5
R SH	71.2 ± 9.5†#	87.4 ± 5.3†	119.6 ± 8.3
R TBARS	2.75 ± 0.33	2.66 ± 0.23	2.31 ± 0.21
C GSH	233.0 ± 4.5	299.1 ± 3.9	242.3 ± 7.0
C SH	66.5 ± 2.4†#	76.6 ± 1.6	100.1 ± 1.3
C TBARS	1.62 ± 0.15†#	0.88 ± 0.08	0.52 ± 0.03

* $p < 0.01$ vs. Control; # $p < 0.05$ vs. STZ+E; † $p < 0.05$ vs. Control.

Estos resultados sugieren que, además de los mecanismos conocidos, el E podría proteger el tejido renal y cardíaco atenuando el OxS.

149. Accion de los peptidos RGD en la insuficiencia renal aguda (IRA) tubulotóxica. Verónica A. De Luca Sarobe, Elisabet M. Oddo, Jorge Toledo, Juan A. Barcat, Elvira E. Arrizurieta.

IIM A. Lanari, UBA. Bs.As.

La alteración fundamental en la IRA es la disminución del filtrado glomerular y la necrosis de las células tubulares epiteliales que forman conglomerados por una alteración en la adhesión célula-célula y a la membrana basal. Los péptidos RGD pueden, al bloquear los receptores que median la adhesión, inhibir este proceso y mejorar el curso de la enfermedad. Estudiamos la acción de dichos péptidos en un modelo de IRA tubulotóxica por dicromato de potasio (DCP), 1,5 mg/100 g PC vía SC en ratas Wistar macho. Un grupo de ratas recibió DCP y se utilizó como control y otro recibió, además, los péptidos (DCP+RGD), 36 µg/rata intra arterial, 2 y 4 hs posttóxico. Todos los grupos fueron estudiados a las 48 y 72 hs, realizándose extracción de sangre para medir urea y extirpación de ambos riñones para su estudio anatomopatológico. Los resultados de urea plasmática fueron:

Hs posttóxico	48 hs	72 hs
DCP	1.05 ± 0.29	2.31 ± 0.5
DCP + RGD 2 hs	1.06 ± 0.17	0.30 ± 0.06*
DCP + RGD 4 hs	0.99 ± 0.8	0.41 ± 0.04*

* $p < 0.02$ vs DCP

La anatomía patológica mostró en una escala de 1 a 4, un grado de lesión de 3 y 4 a las 48 y 72 hs respectivamente en DCP y ninguna alteración morfológica significativa en las DCP + RGD. Se concluye que la administración de los péptidos protege del daño inducido por el tóxico debido a su probable acción sobre la adhesión celular.

150. Hipertensión, sexo y sistema kalikreina kinina (SKK). R. Krmar[#], E.M. Oddo^{*}, V.A. De Luca^{*}, H. Herrera^{*}, J. Toledo^{*}, A. Scerbo^{*}, R. Martín^{*}, F. Ibarra^{*}, E.E. Arrizurieta^{*}.

*IIM A. Lanari-UBA; # Htal. Italiano. Buenos Aires.

Estudios previos mostraron una regulación diferente de la presión sanguínea, SKK y filtrado glomerular (FG) en ratas Wistar

macho (M) y hembra (H), controles o uninefrectomizadas. En este trabajo, nos interesó estudiar el curso de la hipertensión en ratas M y H espontáneamente hipertensas (SHR) desde el destete hasta la semana 12 de vida, en relación con el sexo, la actividad del SKK, función renal y perfil hormonal. La presión arterial sistólica (PAS) medida entre las semanas 8^o y 12^o, fue mas alta en M que en H; 175.8 ± 3.7, 174.5 ± 13.3, 173.4 ± 7.9 y 180.9 ± 8.5 mmHg para M y 143.8 ± 5.9, 158.3 ± 9.9, 163.4 ± 5.8 y 161.5 ± 13.4 mmHg para H (p<0.05). La excreción de KU disminuyó en M al final del 3^o mes de vida respecto a H: 45.7 ± 2.5 vs 24.3 ± 1.1 nkat/100gPC, (p<0.01). Los valores de actividad de renina plasmática, aldosterona y renina activa no fueron diferentes entre M y H: 12.2 ± 0.81 vs 13.3 ± 0.82 ng/ml/h; 129.3 ± 25.1 vs 157.7 ± 46.3 pg/ml y 2.81 ± 0.64 vs 4.55 ± 0.89 µU/ml, respectivamente. La excreción diaria de agua, Na⁺ y K⁺, expresada por 100gPC, fue mas baja en M que en H: 5.26 ± 0.3 vs 8.26 ± 0.9 ml, 0.6 ± 0.09 vs 0.88 ± 0.02 mEq y 1.79 ± 0.13 vs 2.57 ± 0.17 mEq, respectivamente (p<0.01 en todos los casos). No se observó diferencia entre M y H en FG, FPR y fracción filtrada. La menor PAS y mayor excreción de KU, observada en ratas H, sugiere un rol del SKK en la regulación de la presión arterial en relación al sexo. Los cambios observados en la excreción de agua y electrolitos también podrían estar involucrados.

151. Uninefrectomía precoz, crecimiento renal compensador (CRC) y regulación de la presión arterial en ratas hembra. Elisabet M. Oddo, Fernando R. Ibarra, Verónica A. De Luca Sarobe, Jorge Toledo, Rodolfo S. Martin, Elvira E. Arrizurieta.

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA.

Hemos observado que el CRC y la excreción de Kallikreina (KU), consecutivos a la remoción parcial de la masa renal en ratas adultas jóvenes (uNx B), evaluadas a los 150 días de vida, es menor en ratas hembra (H) que en machos (M), y que la ovariectomía (oVx) compensa el déficit mencionado. Nos interesó estudiar la respuesta renal a la uninefrectomía practicada precozmente, 5 días de vida (uNx A), en ratas oVx a los dos meses de edad. Se observaron los siguientes resultados:

	PR g	FG/gR ml/min/g	PAM MmHg	KU/gR nkat/d/g
H control	1.7 ± 0.07 ^a	0.80 ± 0.08 ^k	111 ± 2.53	27.6 ± 4.9 ⁿ
H uNx A	1.3 ± 0.06 ^b	0.80 ± 0.04 ^g	106 ± 6.22	19.9 ± 3.5
H uNx B	1.3 ± 0.07 ^c	0.60 ± 0.01 ⁱ	108 ± 7.52	28.3 ± 5.3 ^o
oVx control	1.9 ± 0.05 ^d	0.80 ± 0.07	93 ± 8.29 ^l	48.7 ± 7.2 ^h
oVx uNx A	1.2 ± 0.03 ^e	0.95 ± 0.05 ^h	130 ± 10 ^m	31.9 ± 7.2
oVx uNx B	1.5 ± 0.07 ^f	0.91 ± 0.05 ^j	100 ± 20	50.3 ± 4.3 ^p

a vs b y c, d vs e y f, i vs j, o vs p (p<0.01); a vs d, l vs m, n vs ñ (p<0.05)

La oVx no compensó el CRC ni la excreción de KU en ratas con uNx precoz, que por otra parte, desarrollaron hipertensión arterial. El Sistema Kallikreina Kinina participaría en la regulación de la presión arterial.

152. El factor natriurético atrial y la angiotensina II regulan el metabolismo de la dopamina renal. Alicia Correa, Marcelo Choi, Pablo Schwartz, Belisario Fernández.

Cátedra de Fisiopatología, CONICET. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. bef@arnet.com.ar

Los efectos natriuréticos del factor natriurético atrial (ANF) y antinatriuréticos de la angiotensina II (ANG II), pueden ser mediados por la dopamina (DA) renal. Observamos que el ANF (99-126), incrementa la captación de ³H-DA en riñón sin alterar la incorporación del precursor L-DOPA, ni la secreción de DA. (Medicina 57,16,1997;59,614,1999). Se caracterizó el tipo

de captación extraneuronal que fué hidrocortisona (HC) sensible (C: 4.00 ± 0.29, E: 2.64 ± 0.16) y temperatura (C 37°: 12.04±0.47, C 0°: 4.40±0.38, E37 °: 3.52±0.57, E 0°: 1±0.15) y Na⁺ (C: 6.59 ± 0.43, E: 4.09 ± 0.19) dependiente y que se produciría por estimulación de los receptores tipo A vía GMPC pues se inhibe con el azul de metileno (C: 2.60 ± 0.25, E: 1.44 ± 0.13). La ANG II inhibió la captación de DA (C: 11.18 ± 0.47, E: 4.96 ± 0.27). Por otra parte el turn over de ³H-DA fue disminuido por el ANF y aumentado por la ANG II (C: -0.59; ANF: -0.30; ANG II: -0.72). Los resultados se expresan en d.p.m.10⁵/g (X±ES) y el turn over como la pendiente de la curva de regresión x10⁻² C: control; E: experimental. Los resultados sugieren que parte de los efectos natriuréticos del ANF (haloperidol sensibles) se producen por aumento de la disponibilidad de DA renal con la consiguiente estimulación de receptores D₁ y la inhibición de la Na⁺,K⁺-ATPasa. La antinatriuresis de la ANG II se debería a efectos opuestos a los mencionados.

153. Efectos del HgCl₂ sobre flujos aniónicos en piel del sapo Bufo arenarum, modelo del nefrón distal. Gabriel Orce, Graciela Castillo, Atilio Costa Vitali y Yolanda Chanampa.

Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina- Universidad Nacional de Tucumán. e-mail: orcegap@unt.edu.ar

El HgCl₂ agregado al baño apical (externo) inhibe la permeabilidad al agua al bloquear las acuaporinas (AQPs) existentes en esa cara de la piel del sapo. En el baño dérmico (interno), sin embargo, el HgCl₂ aumenta la permeabilidad al agua y al Cl⁻, en forma similar a lo observado por exposición al HgCl₂ de la recientemente descrita AQP-6, hallada hasta ahora sólo en membranas intracelulares del nefrón distal de rata. Describimos aquí el efecto del HgCl₂ en el baño dérmico sobre los flujos unidireccionales de aniones radioactivos (J*) en pieles bañadas por solución de Ringer, que en el baño apical contenía ^{99m}TcO₄⁻ (304.0 uCi/ml), ¹³¹I⁻ (2.7 uCi/ml) y ³⁶Cl⁻ (3.1 uCi/ml). Se obtuvieron muestras en duplicado del baño dérmico cada 30 min durante 5 h, reemplazando el volumen extraído con la misma solución; al final del experimento se obtuvieron muestras del baño apical. El ^{99m}Tc y el ¹³¹I fueron contados inmediatamente, y el ³⁶Cl tres meses más tarde. El HgCl₂ en el baño dérmico incrementó los flujos de ³⁶Cl⁻ (de 6.8 ± 1.3 a 27.3 ± 4.9 nEq/h.cm², P_{diff}<0.01) y ¹³¹I⁻ (de 11.4 ± 1.2 a 23.6 ± 1.2, P_{diff}<0.01) pero no de ^{99m}TcO₄⁻ (de 121.7 ± 6.0 a 107.7 ± 20.7, P_{diff}: NS)(n= 5). Esto confirma que el HgCl₂ dérmico aumenta la permeabilidad aniónica en forma selectiva, sugiriendo que el pasaje se realiza por vía trans-celular. En conjunto, la información existente parece indicar que los pasajes de agua y aniones se llevan a cabo por una única vía, lo que sería consistente con la presencia de AQP-6 en membranas celulares externas de la cara dérmica de la piel de sapo.

GASTROENTEROLOGIA I

154. Pioglitazona como antiinflamatorio y en colitis experimental. Oscar Laudanno, Lucas Rista, Fernando Miassi, José Esnarriaga, José Cesolari, Alicia Godoy.

Gastroenterología Experimental. Cátedras Gastroenterología e Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas de Rosario. (Fax 0341-4393511).

Pioglitazona (Pio) y Rosiglitazona (Ro) son agonistas PPAR gamma e inhibidores del NF-KB, de las citoquinas pro-inflamatorias y la COX-2; podrían tener efectos antiinflamatorio en el edema de la pata de la rata por carragenina (Ca) y en colitis experimental. Grupos ratas Wistar (n=10 c/g), 200 g, ayuno 24 hs; se realizó: Experiencia I: 1. Ca plantar 100 ul 1% (T). Pre-tratamientos: 2. Indometacina (In) 30 mg/Kg orogástrico (OG) y se esperó 60 min. 3. Rofecoxib (Rofe) 30 mg/Kg. 4. Ro 2 mg/ Kg. 5. Pio 5-30 mg/Kg. Exp. II: 1. Ac. acético (AA) 0,5 ml 20% intrarrectal y se esperó 2 hs. (T). 2. Pretratamientos: In, Rofe, Ro y Pio. En I el área edematosa

plantar se tabuló c/h 4 hs., por fotografía digital y planimetría computada. En // las ratas fueron sacrificadas previa sobredosis de éter, laparotomía, colectomía, su apertura, fotografía, tabulación área macrosc. necrótica; histología H.E. y MPO. Se calculó t Student y ANOVA. En I: Ca 130±20%, In 60±5 (P<0,01); Rofe 50±10; Ro 25±5; Pio 5±2 (P<0,001). En II: AA 510±25 mm²; In 950±45 (P<0,01); Rofe 970±55; Ro 215±15; Pio 55±7 (P<0,001). La MPO dio: AA 496±82 U/100 mg proteína; In 1200±81 (P<0,01); Rofe 1400±75; Ro 210±44; Pio 85±16 (P<0,01). Conclusiones: Pio dio marcado efecto antiinflamatorio ante la Ca, superior a In y Rofe, protegió la mucosa colónica y podría postularse en el tratamiento de la colitis ulcerosa.

155. Funcionalidad a largo plazo de hepatocitos porcinos cultivados sin matrices exógenas. Alicia Lorenti, Mariana Barbich, Andrea Schenone, Adolfo Guinle, Néstor Chamoles, Patricia Sorroche, Alejandro González y Pablo Argibay.

*Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires.
e-mail: alorenti@hitalba.edu.ar*

Un hígado bioartificial requiere gran número de hepatocitos viables y funcionales capaces de sostener las funciones de detoxificación de un paciente en falla hepática. Para ello, es necesario mantener dichas células en cultivo, con las funciones conservadas. El objetivo de este trabajo es mostrar la funcionalidad in vitro y a largo plazo de hepatocitos porcinos cultivados en monocapa, sin el agregado de matrices exógenas. Las células fueron obtenidas a partir de hepatectomías parciales o totales, y cultivadas en un medio suplementado con factores de crecimiento. La capacidad de detoxificación se evaluó a través del metabolismo de diazepam y lidocaína. El metabolismo de diazepam se midió por la aparición de sus metabolitos temazepam y oxazepam por períodos de hasta 15 días, siendo el pico máximo al día 6 (13,52 +/- 8,02 ug/ml y 0,014 +/- 0,004 ug /ml respectivamente). El metabolismo de lidocaína se evaluó a través de la aparición de MEGX, su principal metabolito, que tuvo un pico el día 4 (156,50 +/- 10,10 ng/ml), y niveles detectables por 30 días. Podemos concluir que, al igual que demostramos previamente con hepatocitos de rata, las células hepáticas porcinas pueden desarrollarse in vitro, manteniendo su viabilidad y funcionalidad, sin el agregado de matrices exógenas.

156. Expresión y regulación del canal de agua aquaporina-8 (AQP8) en hepatocitos. Fabiana García, Arlinet Kierbel, María Larocca, Sergio Gradilone, Patrick Splinter, Nicholas LaRusso, Raúl Marinelli.

*Instituto de Fisiología Experimental-CONICET, Universidad Nacional de Rosario; Center for Basic Research in Digestive Diseases, Mayo Clinic, EE.UU.
e-mail: rmarinel@sede.unr.edu.ar*

Previamente demostramos que el transporte de agua a través de la membrana plasmática del hepatocito se produce por un mecanismo no mediado por aquaporinas (JBC 271:6702, 1996), no obstante, recientemente se encontró en esas células ARNm para AQP8. Para clarificar este tema, estudiamos la expresión proteica, localización subcelular y posible regulación de AQP8 en hepatocitos de rata. Por fraccionamiento subcelular e inmunoblotting se detectó una banda N-glicosilada de 34 kDa correspondiente a AQP8 en membranas plasmática e intracelulares. Inmunofluorescencia y microscopía confocal mostraron una predominante localización intracelular (vesicular) de AQP8. Células tratadas con dibutilil AMP cíclico (DBAMPc) presentaron disminución intracelular (-58% p< 0.05, n:3) y aumento en membrana plasmática (+125% p<0.05, n:3) de AQP8. DBAMPc incrementó además en 70% la permeabilidad al agua de la membrana del hepatocito, evaluada por video microscopía. DMSO, inhibidor de aquaporinas, bloqueó com-

pletamente dicho incremento. **Conclusión:** AQP8 se localiza principalmente en vesículas intracelulares en hepatocitos de rata y redistribuye hacia la membrana plasmática por estímulo con DBAMPc, incrementando así la permeabilidad al agua. Un proceso de potencial importancia en la regulación de la secreción biliar primaria.

157. Cultivo de esferoides de hepatocitos de cerdo, con mantenimiento de las funciones de detoxificación.

Alicia Lorenti, Mariana Barbich, Patricia Sorroche, Andrea Schenone, Adolfo Guinle, Néstor Chamoles, Jorge Pecci-Saavedra, Sung Ho Hyon y Pablo Argibay.

*Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires.
e-mail: alorenti@hitalba.edu.ar*

La limitada disponibilidad de órganos para trasplante ortotópico de hígado requiere el desarrollo de terapias alternativas para pacientes con falla hepática aguda. Una de ellas utiliza células hepáticas en cultivo, ya sea en monocapa o con agitación. El objetivo de este trabajo fue evaluar la funcionalidad de hepatocitos de cerdo cultivados con agitación, lo cual los estimula para la formación de agregados esferoidales. Los hepatocitos de cerdo fueron aislados por doble perfusión in vivo/ex vivo y cultivados en medio E-Williams con insulina, hidrocortisona, glutamina, ácido ascórbico, suero fetal bovino y antibiótico/ antimicótico. El cultivo fue realizado en frascos con agitación constante. Como marcador de detoxificación fue usado el metabolismo de diazepam, a través de la aparición de sus metabolitos temazepam y oxazepam. Su presencia fue detectada durante todo el período de estudio (6 días), con un máximo al día 1 (temazepam: 18,37±10,79 ug/ml, oxazepam: 0,11±0,07ug/ml), concordante con la máxima disminución de diazepam (30,42 %). La microscopía electrónica confirmó la presencia de células hepáticas viables en los esferoides, con organelas conservadas. La posibilidad de obtener esferoides, capaces de mantener una importante capacidad de síntesis y de detoxificación, permitiría su aplicación en el desarrollo de sistemas de hígado bioartificial.

158. Caracterización de las distintas poblaciones presentes en cultivos primarios de hepatocitos porcinos y de rata. Alejandra Hidalgo, Alicia Lorenti, Mariana Barbich, Esteban Mocetti, Sung Ho Hyon y Pablo Argibay.

*Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires.
e-mail: ahidalgo@hitalba.edu.ar*

En el hígado, el nivel de organización tisular está dado por la presencia de distintas poblaciones celulares, de cuya heterogeneidad surge la funcionalidad del mismo. Sin embargo, en el cultivo primario de células hepáticas es habitual seleccionar un tipo celular particular. En trabajos anteriores hemos demostrado la capacidad de detoxificación de cultivos primarios, sin el agregado de matrices exógenas, en los cuales coexisten diversos tipos celulares. Estos cultivos presentan inicialmente la morfología de una monocapa de células parenquimatosas, que evoluciona formando agregados, rodeados de células de tipo fibroblástico. El objetivo de este trabajo fue caracterizar, por inmunohistoquímica, los distintos tipos celulares obtenidos. Las tinciones se realizaron sobre la superficie de cultivo. Se evaluaron albúmina, citoqueratinas 8, 19 y 14, vimentina, alfa-actina y alfa-feto-proteína. Se demostró la presencia de hepatocitos en los agregados celulares (albúmina y citoqueratina 8 +), con algunas células citoqueratina 19 + en su superficie. La monocapa que rodea los agregados posee las características de las células de Ito (alfa-actina +). La coexistencia de varios tipos celulares en un cultivo primario a largo plazo, sin el agregado de matrices, pondría en evidencia un estado de equilibrio entre todos ellos, lo cual indicaría un cierto grado de organización tisular.

- 159. Efecto de la hormona de crecimiento (HC) sobre la absorción/síntesis de triglicéridos por el intestino de la rata.** Eriberto Roveri, Gustavo Chapo, Hilda Abranzon, Irene Grappiolo y Rodolfo Puche.

Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Ciencias. Médicas, Rosario. e-mail: rpuche@unrctu.edu.ar

Este trabajo refiere el aumento de la concentración de triglicéridos en el plasma [TG] de ratas adultas después de recibir un ug de HC por vía endovenosa. Se utilizaron hembras IIM/FcM, "m", de 200-250 g, con 12 hs de ayuno. La [TG] aumentó x 4 con un máximo entre 1 y 3 horas después de la inyección. Con el objeto de asegurar la disponibilidad de grasa en el intestino, los animales ayunaron durante 24 horas. Consumieron totalmente 10 g de semillas de girasol (4.7 g de grasa) en la primera media hora del experimento. La [TG] aumentó de 50 ± 4 mg/dL a 1606 ± 210 mg/dL. Al azar, los animales se dividieron en dos grupos y se les midió [TG] a intervalos de una hora. Al completarse la tercer hora del experimento, un grupo recibió 1 ug de HC/rata por vía ev. La [TG] de los animales controles disminuyó exponencialmente. Los animales inyectados con HC mostraron el mismo fenómeno a un nivel superior de [TG]. Se perfundió "in situ" el duodeno de ratas con KR (0.08 ml/min) por la arteria mesentérica superior durante 3 horas. Se recogieron 15 muestras, de un ml cada una, de la vena porta. Después de la muestra número 7 se incorporó HC (5 ug/dL) al buffer de perfusión. La [TG] se mantuvo constante (25 ± 3 mg/dL) en la primera mitad del experimento, creciendo de manera lineal por efecto de la HC. La perfusión del duodeno con genisteína (inhibidor de una tirosinkinasa) 1 uM no modificó la [TG] y anuló la respuesta a la HC. Se concluye que la HC estimula la síntesis/absorción de triglicéridos por el intestino.

HEMATOLOGIA II

- 160. Estabilidad a largo plazo de colinesterasa eritrocitaria (AChE) y plasmática en sangre humana entera estabilizada (SHEE).** María Fernández Alberti, Nilda Fink.

Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. (fink@nahuel.biol.unlp.edu.ar).

Las colinesterasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los ésteres de colina. Se describen dos tipos: la acetilcolinesterasa o colinesterasa eritrocitaria, y la butirilcolinesterasa o colinesterasa plasmática. La AChE es una enzima de la membrana eritrocitaria, cuya actividad disminuye progresivamente con el envejecimiento del eritrocito, ya que está influenciada por la composición y la fluidez lipídicas y por el potencial de interfase. Con el fin de estudiar la variación, in vitro, de la actividad de estas enzimas en el tiempo, se realizaron experimentos en los cuales se midieron, cada diez días, durante un período de 120 días de almacenamiento a 4°C, las actividades en alícuotas de SHEE. Así mismo, se probó el efecto de la adición de antioxidantes (vitamina E, vitamina C y mezclas de ambas). Las actividades se midieron cinéticamente a 412 nm usando yoduro de acetilcolina como sustrato para la AChE y, a 405 nm usando butirilcolina para la plasmática. La actividad de la AChE mostró diferencias significativas al comparar la sangre sin estabilizar con la SHEE ($p < 0.0001$). En SHEE, los valores de actividad de la butirilcolinesterasa son constantes durante los 120 días (rango: 2221-3877 U/L) en tanto que, los de AChE no varían entre los días 10 y 40 (rango: 4039-4693 U/L de células). La adición de antioxidantes que ayudan a mantener la integridad de la membrana eritrocitaria, no aportó mejoras a la estabilización, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos ensayados ($p = 0,449$).

- 161. Influencia de los niveles plasmáticos de fV y fVIII en la técnica modificada de resistencia a la Proteína C activada (APCRm).** Laura Gennari, Alicia Blanco, Silvia Grosso, Emilse Bernejo, María Lazzari.

Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R Castex", Academia Nacional de Medicina.

La resistencia a la Proteína C activada (PCa) se define como una pobre respuesta anticoagulante del plasma a la PCa, cuya función es inactivar fVa y fVIIIa. Se asocia a trombosis y en la mayoría de los casos se debe a la mutación R^{506Q} del fV, conocido como FV Leiden (FVL). El fenotipo resistente también ha sido descrito en pacientes con aumento de fVIII o inhibidor lúpico (IL) y estaría también asociado a riesgo trombotico. La APCRm (dilución del plasma del paciente 1/5 en plasma deficiente en fV) está especialmente diseñada para detectar el FVL. Nos propusimos evaluar si los valores de APCRm se ven afectados por los niveles de fV y fVIII. Para ello seleccionamos 179 pacientes del protocolo de trombofilia a los que se les determinó la concentración de fV y fVIII (1 etapa), la APCRm (COATEST APCTM Resistance V, CHROMOGENIX) y el IL (SSC-ISTH). En 17/17 pacientes con APCRm anormal se detectó el FVL por PCR/Mnl I. No hallamos correlación entre el valor de APCRm y los niveles de fV ($r_{\text{Spearman's}} = 0,117$; $p = 0,119$) o fVIII ($r_{\text{Spearman's}} = 0,008$; $p = 0,920$). Tampoco hallamos diferencias significativas ($p_{\text{Mann-Whitney}} = 0,645$) entre los valores de APCRm en IL+ (mediana = 2,6) e IL- (mediana = 2,66). La APCRm no estaría influenciada por los niveles de fV o fVIII, ni por la presencia de IL. El fenotipo resistente por aumento de fVIII o presencia del IL, debería ser detectado utilizando la técnica original.

- 162. Niveles plasmáticos de factor II en heterocigotas para la variante 20210A de la protrombina.** María Julieta Salviú, Alicia Blanco, María Victoria Nadal, Silvia Grosso, María Lazzari.

Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina.

La protrombina 20210A es una mutación/transición descrita por Poort S.R. y col. en 1996, caracterizada por el reemplazo G@A en la posición 20210 del gen de la protrombina. Esta variante molecular estaría relacionada con niveles aumentados de factor II. Con el propósito de evaluar si es posible establecer un valor de corte que permita identificar los portadores de la variante 20210A, evaluamos los niveles plasmáticos de factor II en 9 heterocigotas y 98 normales. La actividad coagulante del factor II fue medida mediante la técnica en una etapa y la determinación inmunológica por la técnica de Laurell. El reemplazo G@A en la posición 20210 del gen de la protrombina fue analizado aplicando la técnica de alelo-específico. Los valores de factor II coagulante correlacionaron con el dosaje inmunológico ($r_{\text{Pearson}} = 0,301$). No observamos diferencias significativas ($p_{\text{Mann-Whitney}} > 0,1$) entre heterocigotas y normales para los niveles promedio de factor II coagulante ($FI_{II} : 105,0 \pm 3,12$; $FI_{II} : 103,36 \pm 1,90$) o inmunológico ($FI_{II} : 120,00 \pm 6,90$; $FI_{II} : 115,37 \pm 3,70$). Los resultados obtenidos sugieren que no es posible establecer un valor de corte para el factor II, coagulante o inmunológico, que permita identificar pacientes con riesgo de ser portadores de la variante molecular 20210A.

- 163. Las plaquetas poseen receptor soluble de interleuquina 6.** Rosana F. Marta, Paola R. Lev, Nora P. Goette, Carlos J. Pirola, Felisa C. Molinas.

Sección Hematología Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA. (rmarta@usa.net)

Se ha descrito la presencia de gp130 (glicoproteína necesaria para la traducción de señal de la IL-6) en la membrana plaquetaria, sin embargo, la presencia de subunidad de unión específica (IL-6R) no ha sido demostrada. En este estudio evaluamos plaquetas normales en busca de: a) la presencia del IL-6R en la membrana por estudio de binding con 125 I-IL-6, por citometría de flujo (FACs) con IL-6-biotina y avidina-FITC, y con un anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 (CD126) unido a ficoeritrina; b) la presencia del receptor soluble (IL-6sR) intraplaquetario por lisis celular y detección por ELISA y c) estudio del RNA mensajero de IL-6R e IL-6sR por RT-PCR utilizando un juego de primers que permite la amplificación tanto del cDNA que posee el fragmento transmembrana como el que no lo tiene. La expresión del IL-6R por FACs utilizando IL-6 mostró 3 a 28% de marcación (n=8) de baja intensidad, mientras que tanto la marcación con CD126 como el estudio de binding arrojaron resultados negativos. La determinación del IL-6sR intraplaquetario mostró la existencia de dicha proteína (403 pg/10⁶ plaq, mediana de 16 normales) y en el estudio de RT-PCR se observaron dos fragmentos, uno correspondiente a IL-6R y otro a IL-6sR. En conclusión, si bien no se demostró la presencia del receptor anclado a membrana, se halló el receptor soluble intraplaquetario y el RNA mensajero para IL-6R e IL-6sR.

164. Prevalencia de factor V Leiden, Protrombina G20210A y C677T MTHFR en Trombocitemia Esencial. Paula Heller, Valeria Genoud, Mercedes Castañón, Gabriel Correa, Laura Kornblit, Patricia Vassallu, Lucía Kordich, Felisa Molinas.

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. e-mail: fmolinas@ mail. retina.ar.

Los factores predictivos de trombosis en Trombocitemia Esencial (TE) no han sido aún establecidos. Nos propusimos evaluar la coexistencia de trombofilia hereditaria en 41 pacientes con TE, 7 con trombosis (T) (1 IAM, 1 portal, mesentérica y esplénica, 4 ACV, 1 arterial periférica) y 17 con obstrucción de microcirculación (OM), que presentaban niveles normales de AT III, PC y PS. Se estudiaron, por medio de PCR y análisis de los fragmentos de restricción, los polimorfismos Arg506Gln (V Leiden), Protrombina G20210A (PT) y C677T en el gen de la metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y además la resistencia a la proteína C activada (aPCR) por sustrato cromogénico, homocisteinemia por ELISA y agregación espontánea. La prevalencia de polimorfismos en pacientes con TE con respecto a la población normal (n=418) fue: V Leiden 2.43% vs 2.87%, PT 7.3% (3/41, 1 homocigota) vs 2.63%, p =NS; MTHFR heterocigota 56% vs 43%, homocigota 7.3% vs 15.5%, frecuencia alélica 35.3% vs 37%. Se encontró aPCR en 3/41 (1 con V Leiden), agregación espontánea en 14/38 (71.4% sintomáticos) e hiperhomocisteinemia en 3/41. La mediana de los niveles de homocisteína no difirió entre los distintos grupos clínicos. La prevalencia de V Leiden, PT y MTHFR en TE no difirió significativamente de la población normal ni entre los pacientes que desarrollaron T u OM respecto a los asintomáticos. Estos defectos asociados con trombofilia hereditaria no parecen constituir factores de riesgo para trombosis en pacientes con TE.

165. Origen de los niveles plasmáticos de TGFb y bFGF en pacientes con trombocitemia esencial. Paola R Lev, Rosana F Marta, Carlos J Pirola, Alfredo Molinolo, Felisa C Molinas.

Sección Hematología Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de medicina, Universidad de Buenos Aires e instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires. Fax:4523-8947

La trombocitemia esencial (TE) se caracteriza por aumento del recuento plaquetario (rto pl.). En un estudio previo se demostró aumento de TGFb y bFGF plasmático y del bFGF

intraplaquetario, que no se normaliza cuando el rto pl. disminuye por el tratamiento con anagrelide. Para determinar la causa de la persistencia del aumento plasmático de los factores durante el tratamiento, se estudiaron en 5 pacientes: 1) la presencia de estas citoquinas en la fracción mononuclear de sangre periférica (FMSP) por inmunofluorescencia con anticuerpos para identificar megacariocitos (MK) (CD61) y para los factores, 2) el nivel del ARNm intraplaquetario por RT-PCR semicuantitativa utilizando primers específicos para los factores y para un gen constitutivo de referencia. La inmunofluorescencia demostró que los MK marcan intensamente para ambas citoquinas mientras que los linfocitos lo hacen más débilmente tanto en pacientes como normales. El nivel de ARNm para TGFb se encontró aumentado (p<0.02) y disminuye con el tratamiento (relación TGFb/microglobulina: 0.8 y 0.67, normal: 0.38), mientras que el del bFGF se encontró normal (relación bFGF/GAPDH: 0.73 y 0.79, normal: 0.70). La persistencia del aumento plasmático de TGFb podría deberse a una fuente celular diferente a las estudiadas. El incremento del bFGF podría explicarse por liberación plaquetaria dado que la proteína está aumentada en las plaquetas; la desregulación sería postranscripcional ya que el nivel del ARNm se encontró normal.

GENETICA II

166. Distribución de polimorfismos del gen CCR5 en población de dadores en banco de sangre de Argentina. Carlos Rocco, Andrea Mangano, Luisa Sen.

Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus. Hospital de Pediatría J. P. Garrahan. Capital Federal. Argentina. (charso@usa.net).

Se ha encontrado una serie de asociaciones entre los diferentes polimorfismos en el gen del CCR5, co-receptor principal de las cepas M-trópicas del HIV-1, con transmisión y progresión a SIDA. La distribución de estas variantes depende de particularidades geográficas y étnicas de cada región. La caracterización de la población argentina fue el principal objetivo de este trabajo. Se evaluó la presencia de los polimorfismos más comunes en una población de donantes de sangre HIV-1 seronegativos del Hospital Garrahan (n=102). Se utilizó la técnica de PCR-RFLP para la determinación del CCR2-641 y cada uno de los 6 polimorfismos en la región promotora del CCR5: A58755G, G58934T, T59353C, T59356C, G59402A, T59653C de la secuencia U95626.1 del Genbank. CCR5-d32 se determinó por PCR amplificando esta región polimórfica. La filogenia de los polimorfismos define 9 haplogrupos. Las frecuencias obtenidas fueron: A 7,1%, B 1,6%, C 34,2%, D 1,6%, E 28,8%, F1 2,2%, F2 16,3%, G1 6,5% y G2 1,6%. Diez individuos presentaron diferentes polimorfismos no incluidos en esta clasificación y considerados "recombinantes". Se hallaron 23 diferentes combinaciones genotípicas, entre ellas las más frecuentes E/C (12%), C/C (5%), C/F2 (5%), A/E (4%). Estos resultados indican que los haplogrupos predominantes en la población estudiada son C, E y F2, como fue observado anteriormente en otras poblaciones hispano-americanas, siendo C/E el genotipo más frecuente.

167. Estudio molecular de la deficiencia de 21- hidroxilasa clásica y no clásica. Carolina Minutolo, Noemí Buzzalino, Adriana Oneto, Susana Bellis, Mirta Stivel, Titania Pasqualini, Eduardo Charreau, Liliiana Alba y Liliiana Dain.

Centro Nacional de Genética Médica, Servicio de Endocrinología Hospital Durand, Servicio de Pediatría Hospital Italiano, Instituto de Biología y Medicina Experimental y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA. (ldhv@sinectis.com.ar)

El objetivo del presente trabajo es la caracterización molecular de la deficiencia de 21-hidroxilasa en un grupo de 41 pacientes: 25 no clásicos (NC) y 16 clásicos (C), pertene-

cientes a 36 familias. El diagnóstico se basó en la clínica y los valores de hormonas esteroideas en sangre. Nueve mutaciones puntuales del gen CYP21B se analizaron por PCR alelo-específica o digestión con enzimas de restricción. La mutación más frecuente para la forma NC fue V281L (39,5%), mientras que no se detectó la mutación P30L. Para las formas C, fue A/C-G en el intrón 2 (16,6%). Se observó un aumento en la frecuencia de R356W en ambos grupos, así como en la de Del 8bp (6,9% y 13,7%, y 4,6% y 14,2% NC y C respectivamente). Fueron caracterizados 69,8% y 83% de los cromosomas para la forma NC y C respectivamente, similar a otros estudios con 15 mutaciones analizadas. El 63,4% de los pacientes fue totalmente genotipificado, hallándose una alta correlación genotipo/fenotipo. Si bien el valor de corte para 17OHP post ACTH es 10 ng/ml, el valor mínimo observado entre los pacientes NC totalmente genotipificados fue de 14 ng/ml. El alto número de alelos NC no identificados sugeriría la presencia de mutaciones menos frecuentes como causantes de la enfermedad. Alternativamente, el valor de corte para el test de ACTH estaría sobrestimando el diagnóstico de la forma NC al incluir a los heterocigotas como pacientes.

168. En hipertensión esencial (HE), la interacción no alélica es más importante que la contribución de genes individuales. Patricia I. Porto, Silvia I. García, Guillermo Dieuzeide, Victoria A. Garfunkel, Fabiana Leonardi, Adrian Perusco, Raúl S. Spataro, Claudio González, Carlos J. Pirola.

CAIDEM (Chacabuco) e Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari (UBA, Bs As).

Los genes del sistema renina-angiotensina-aldosterona, receptor de la TRH (TRHR) y metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) estarían asociados a HE. Evaluamos si la interacción no-alélica (entre genes diferentes) es más importante que la contribución de genes aislados a la base genética de la HE. Se encuestaron 938 estudiantes secundarios de Chacabuco, se tomó la presión arterial (PA) y realizaron medidas antropométricas. Se seleccionaron 175 con PAS > percentilo (Plo) 80 y PAS < Plo 20 a los que se les midió la PA en dos ocasiones y extrajo sangre para análisis clínicos y genotipificación. 54 fueron hipertensos (HT) y presentaron mayor ($p < 0.02$) BMI (24.7±4.9 vs 21.6±3.4), e insulinemia (15.3±9.5 vs 11.3±4.8). La frecuencia de genotipos (PCR más RFLP o ASO), que se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg, de ECA, angiotensinógeno (Ao), receptor AT1, aldosterona sintetasa, TRHR y MTHFR no difirió entre los HT y normotensos (NT). El Z score de la PAS es mayor ($p < 0.03$) en los portadores del alelo D de la ECA (HT, ID+DD: 2.97±1.21 vs II: 2.24±0.63 y NT, ID+DD: -0.16±1.02 vs II: -0.43±1.17) y del alelo 235T del Ao (HT, MT+TT: 2.80±1.16 vs MM: 2.47±0.89 y NT, MT+TT: -0.06±1.05 vs MM: -0.69±0.95). Mediante análisis de ligamiento (test de Fisher con $p < 0.05$) se encontró una frecuencia de desequilibrio entre los loci tomados de a 2, 3, 4, 5 ó 6 que fué 3 veces mayor en el grupo HT que en el NT. Como la distancia entre estos loci es muy grande, no estando relacionada a un ligamiento físico, la interacción entre ellos sería más importante que los genes individuales en la herencia de la susceptibilidad a la afección.

169. Interacción de variantes alélicas de los genes CBS y MTHFR como factor de riesgo en el desarrollo de Defectos de Cierre del Tubo Neural. René Cortese, Noemí Buzzalino, Ernesto Goldschmidt, Mónica Rittler, Graciela Mercado, Liliana Dain.

Centro Nacional de Genética Médica, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Hospital Materno Infantil "Ramón Sardá". (ldhv@sinectis.com.ar)

Las enzimas cistationina beta sintetasa (CBS) y metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) participan de la vía metabólica de la homocisteína. Se ha sugerido que variantes alélicas de estos genes estarían asociadas a Defectos de Cie-

re del Tubo Neural (DCTN). El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la presencia de la inserción de 68 pb (ins 68pb) en el gen CBS como factor de riesgo para DCTN, en forma aislada o en asociación con la mutación termolábil C677T en el gen MTHFR. La muestra analizada consistió en 52 pacientes con DCTN, 50 madres y 43 padres de los afectados y un grupo control de 96 adultos y 25 niños. La genotipificación se realizó por PCR y posterior digestión con BsrI y HinfI para CBS y MTHFR respectivamente. La frecuencia alélica de la ins 68pb no resultó significativamente más alta en pacientes (9,3%) respecto de controles (4,8%) (OR=2,12, 95% IC [0,83-5,37], $p=0,08$). Sin embargo, se halló una diferencia estadísticamente significativa en asociación con la mutación C677T: afectados 17,6%; controles 4,95% (OR=4,11, 95% IC [1,24-13,98], $p=0,01$). Nuestros resultados sugieren que la pérdida de función de los alelos con ins 68pb no constituiría un factor de riesgo para DCTN en la población estudiada sino en combinación con la presencia de la mutación termolábil del gen MTHFR

170. Caracterización de mutaciones en portadores α y β -talasémicos; relación con el fenotipo hematológico. Liliana Rossetti, María Abreu, Amanda Binaghi, Héctor Targovnik, Viviana Varela.

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Fac. de Farm. y Bioq. U.B.A. Servicio de Hemato-Oncología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez". Buenos Aires. Argentina. e-mail: vvarela@huemul.fyb.uba.ar

Las β y α -talasemias son anemias de origen genético que se caracterizan por una menor síntesis de cadenas de β o α -globina. Se estudiaron 269 portadores talasémicos genéticamente no relacionados y 91 familiares de primer grado, por técnicas de Biología Molecular. Se obtuvieron los siguientes resultados: a) en 226 portadores β -talasémicos, 209 presentaron las mutaciones puntuales: -87(C-G): 1 (0,45%); codón 6 (-A): 5 (2,20%); IVS-1 nt 1: 26 (11,50%); IVS-1 nt 6: 16 (7,10%); IVS-1 nt 110: 48 (21,20%); codón 30 (G-C): 2 (0,90%); codón 39: 103 (45,60%); codón 44 (-C): 1 (0,45%); IVS-2 nt 1: 5 (2,20%); IVS-2 nt 745: 2 (0,90%). En 17 pacientes (7,50%), no se tipificó la mutación responsable del defecto. b) en 43 portadores α -talasémicos, se observaron los siguientes genotipos: $-\alpha/\alpha\alpha$: 16 (37,20%); $-\alpha/-\alpha$: 3 (7,00%); $-\alpha/\alpha$: 1 (2,3%); $\alpha\alpha/\alpha\alpha$: 9 (20,90%). Los 14 pacientes restantes (32,60%) no presentaron genotipos deleciones. A nivel fenotípico, el VCM (volumen corpuscular medio) es el índice hematimétrico que mejor se correlaciona con la alteración molecular tanto en β -talasemia (fenotipos β^+ o β^0) o α -talasemia (número de copias de gen de α -globina, que se expresan).

171. Diagnóstico molecular de bocios congénitos por mutaciones en el gen de la tiroglobulina. Identificación de una nueva mutación (deleción C 1143, exón 9). Christian Moya, Carina Rivolta, Philippe Caron y Héctor Targovnik.

Cátedra de Genética y Biología Molecular. Univ. de Buenos Aires, Argentina y Service d'Endocrinologie, Hôpital Rangueil, Toulouse, France.

La prevalencia del hipotiroidismo neonatal es de 1/3.000, lo que indica la importancia del hipotiroidismo y la necesidad del mejoramiento en el diagnóstico con aplicación de nuevas metodologías. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar nuevas herramientas diagnósticas para bocios congénitos con defecto de la biosíntesis de tiroglobulina (TG) e identificar nuevas mutaciones. Se diseñaron primers intrónicos para amplificar por PCR cada uno de los primeros 24 exones del gen de la TG. A cada primer se le agregó una secuencia específica del fago M13 con el objetivo de utilizar un primer universal para la secuenciación. Se estudiaron el ADN genómico de 5 pacientes con diagnóstico de bocio congénito por defecto de tiroglobulina. Uno de estos correspondió a un bocio fetal con un hipotiroidismo diagnosticado durante el 6° mes de embarazo. Una inyección

intra-amiótica de levotiroxina al inicio y al fin del 7º mes de embarazo produjo una disminución del bocio fetal. Luego del nacimiento el análisis del gen de la TG pone en evidencia una nueva delección heterocigota en el nucleótido C 1143 del exón 9, de origen paterno, con cambio del marco de lectura que origina un codón de stop y una proteína teórica de solo 382 AA. El desarrollo de esta metodología para el resto de los exones permitirá optimizar el diagnóstico de esta enfermedad recesiva hereditaria.

COMUNICACIONES EN POSTERS

ENDOCRINOLOGIA III

172. Inhibición de la liberación por estrés de Prolactina en ratas tratadas con un agonista GnRH de acción prolongada. Sergio Justo y Graciela Rossano.

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. e-mail sjusto@arnet.com.ar

Es sabido que ocurre liberación de Prolactina durante el estrés, aunque el mecanismo de acción es poco conocido. Con el objeto de contribuir a aclarar este hecho, hemos utilizado ratas hembra adultas normales, inyectadas con Acetato de Leuprolida de depósito que fueron sometidas a estrés por éter (anestesia) y quirúrgico: extracción de sangre por vía yugular, para medir Prolactina sérica por radioinmunoanálisis e inyectar GnRH natural para asegurar el efecto antagonista de la droga. Los animales fueron sacrificados a 7, 14, 21 y 28 días de la inyección del agonista. Se observó que el Acetato de Leuprolida inhibió la liberación de LH por GnRH a todos los tiempos y disminuyó el peso gonadal en forma significativa, en estas condiciones, la respuesta prolactínica al estrés fue inhibida en los animales tratados (T) con respecto a los controles (C) a los 7 y 14 días. PRL (ng/ml): 7d T: 19±3.0 C: 509.0±86.7 (P 0.0005); 14d T: 24.9±3.1 C: 527.8±85.8 (P 0.0004); 21d T: 590.2±49.9 C: 452.0±113 no significativo (n s); 28d T: 555.4±100.8 C: 652.0±42.9 (n s). Estos resultados permiten concluir que los mecanismos de liberación de Prolactina por estrés son alterados por la acción de un agonista GnRH que extiende su acción al lactotropo actuando posiblemente sobre mecanismos similares a los del gonadotropo y que inhiben la liberación de LH.

173. El lipopolisacárido bacteriano (LPS) disminuye la secreción de prolactina afectando el turnover hipotalámico de dopamina. Andrea De Laurentiis, Daniel Písera, Mariana Candolfi, Adriana Seilicovich.

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. adyseili@fmed.uba.ar

La endotoxemia estimula la síntesis de citoquinas induciendo alteraciones en la secreción de varias hormonas hipofisarias, entre ellas la de prolactina (PRL). Considerando que la liberación hipotalámica de dopamina (DA) es el mecanismo inhibitorio predominante en el control de la secreción de PRL, investigamos la participación del sistema dopaminérgico en el efecto de LPS sobre la secreción de PRL. La administración i.p del LPS (100 y 250 µg/rata) luego de 3 h disminuyó los niveles séricos de PRL (determinados por RIA) [C: 9.61 ± 0.61 ng/mL; LPS 100: 2.87 ± 0.91; LPS 250: 1.83 ± 0.40; n=6-7; p<0.001]. La administración de sulpirida (SUL, 10 µg/rata) 20 min antes del sacrificio aumentó los niveles séricos de PRL. En presencia del antagonista dopaminérgico, el efecto inhibitorio del LPS (250 µg/rata) no fue observado [C: 10.19 ± 0.62; LPS: 4.11 ± 0.49; SUL: 162.74 ± 28.83; LPS+SUL: 131.14 ± 19.57; n=9-10]. También determinamos por HPLC la concentración hipotalámica de DA y DOPAC y los niveles plasmáticos de DA. El LPS aumentó los niveles plasmáticos de DA [C: 0.191 ± 0.030 ng/mL; LPS: 0.379 ± 0.071; n=8; p<0.001] así como la relación DOPAC/DA en el hipotálamo [C: 0.145 ± 0.009;

LPS: 0.190 ± 0.014; n=8; p<0.05]. Estos resultados sugieren que un aumento en la actividad dopaminérgica estaría involucrado en la inhibición la secreción de PRL inducida por la endotoxemia.

174. Influencia de las proteínas de la matriz extracelular sobre la producción de testosterona y AMPc en células de Leydig estimuladas por hCG, in vitro. Emilce Diaz¹, Eliana Pellizari², Silvina Meroni², Selva Cigorraga², Livia Lustig¹, Berta Denduchis¹.

¹Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. ²Centro de Estudios de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez". ciruba@fmed.uba.ar

Previamente demostramos que las proteínas de la matriz extracelular (ME) modifican la morfología, la adhesión y la secreción de testosterona (T) en células de Leydig (CL) en condiciones basales. En este trabajo se estudió la influencia de la ME sobre la producción de T y AMPc en CL estimuladas por hCG (10 ng/ml). Se aislaron CL de rata adulta y se cultivaron en placas recubiertas o no con colágeno IV (C-IV), fibronectina (FN) o laminina-1 (L-1) por un período de 3 ó 24 hs. En los cultivos realizados sobre C-IV o FN se observó una inhibición de la secreción de T (ng/10⁶ células) en ambos tiempos estudiados. Los resultados obtenidos en 3 hs. de cultivo fueron: C-IV: 55.7 ± 5.7*, FN: 80 ± 1.7* vs. sin ME: 91 ± 1.5. En los cultivos realizados por 24 hs. se obtuvieron los siguientes valores: C-IV: 50 ± 4.6*, FN: 144 ± 3.4* vs. sin ME: 158 ± 5.7 (X ± ES, n=8, *P<0.001). En CL cultivadas durante 3 hs. sobre C-IV o FN se detectó una disminución del AMPc secretado (fmoles/10⁶ células): C-IV: 225 ± 7.5*, FN: 304 ± 3.9* vs. sin ME: 480 ± 2.5 (X ± ES, n=4, *P<0.001). La L-1 no afecta la producción in vitro de T ni los valores de AMPc. En conclusión, los resultados indican que el C-IV y la FN disminuyen la esteroidogénesis de las células de Leydig estimuladas por hCG y que este efecto podría estar mediado por una regulación en la producción de AMPc.

175. Prostaglandinas y maduración del feed-back positivo. Ana Franchi, Berta Szwarcfarb, Silvia Carbone, Osvaldo Ponzo y Jaime Moguilevsky.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos e Instituto de Fisiología, facultad de Medicina, Universidad de Bs. As. jmoguile@mail.fmed.uba.ar

La noradrenalina (NA) estimula la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) vía alfa-adrenérgica, hecho que sería facilitado por los estrógenos. En este trabajo se evaluó: el efecto de PGE₂ sobre liberación de LH-RH y la posible interrelación entre NA, PGE₂ y los esteroides sexuales en ratas hembras prepúberes y su influencia en la aparición del mecanismo mencionado. Se determinó la liberación de LH-RH por RIA (pg/ml) de áreas preóptica y medio basal de hipotálamos (APOA/HMB) (n=7-8) de ratas de 15 días, incubados en medio de Earle's con PGE₂ (Control: 2.65 ± 0.12; PGE₂ 10⁻⁶ M: 0.93 ± 0.05; PGE₂ 10⁻⁸ M: 1.39 ± 0.30). En APOA-MBH de otro grupo de animales, pretratados con estrógeno-estrógeno (E-E) o estrógeno-progesterona (E-P) e incubados con NA 10⁻⁵ M, se midió PGE₂ por Radioconversión (% de conversión de ¹⁴C ácido araquidónico/mg de APOA-MBH) (Control: 2.5 ± 0.3; NA: 1.7 ± 0.3; E-E: 3.0 ± 0.2; E-P: 2.9 ± 0.1; E-E+NA: 4.5 ± 0.3; E-P+NA: 3.9 ± 0.2). Los resultados obtenidos indican que en la etapa prepúberal: la PGE₂ inhibe la liberación de LH-RH (p<0.001); la NA no modifica la producción de PGE₂ y la administración de esteroides sexuales aumenta significativamente (p<0.001) la liberación de PGE₂ por NA. Se concluye que el efecto estimulante de la NA sobre la liberación de PGE₂ y LH-RH, estaría relacionado con la maduración del feed-back positivo.

176. Cambios en la sensibilidad del sistema óxido nítrico-LH-RH a los andrógenos durante la maduración sexual en la rata macho. Roxana, Reynoso, Valeria, Rettori,

Silvia, Carbone, Berta, Szwarcfarb, Claudia, Mohn, Osvaldo, Ponzo y Jaime, Moguilevsky.

Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos.

Es conocido que durante la maduración sexual existen cambios en la sensibilidad de centros superiores a esteroides gonadales. Se ha demostrado además que en condiciones fisiológicas el óxido nítrico (NO) estimula la liberación de LH-RH. En el presente trabajo se evaluó: a) Liberación de LH-RH (método RIA) "in vitro" en incubaciones de hipotálamo medio basal de ratas macho de 15 y 30 días, controles y tratadas con propionato de testosterona (25ug/kg de peso). LH-RH se expresó cómo pg/HMB/30 minutos. b) La actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) (método 14C arginina/citrulina) expresada como pmoles de NO/10min/HMB en los mismos grupos experimentales. (n=5-7). La administración de testosterona a ratas de 15 días disminuyó significativamente la liberación de LH-RH respecto del control (1.38 ± 0.17 vs 4.1 ± 0.47 $p < 0.001$) y la actividad de NOS (25.61 ± 1.4 vs 58.41 ± 0.85 $p < 0.001$). Por otra parte el tratamiento en animales de 30 días no modificó la liberación de LH-RH (4.15 ± 0.36 vs 3.6 ± 0.33) ni la actividad de NOS (49.28 ± 1.5 vs 51.48 ± 5.2). Estos resultados sugieren cambios en la sensibilidad a los andrógenos en el sistema de la NOS y en la liberación de LH-RH durante la maduración sexual.

177. Efecto de agonistas metabotrópicos del glutamato y del D-aspartato sobre la liberación de prolactina en cultivos de células adenohipofisarias. Macarena Pampillo, Susana Theas, Beatriz Duvilanski, Adriana Seilicovich, Mercedes Lasaga.

*Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.
e-mail: mlasaga@fmed.uba.ar*

El L-glutamato está involucrado en la regulación de la secreción de hormonas adenohipofisarias, tales como la prolactina (PRL) y la LH, actuando a través de receptores ionotrópicos. Dado que en la adenohipofisis han sido identificados receptores metabotrópicos (mGluRs) clase II investigamos el efecto de agonistas de los mGluRs sobre la liberación de PRL y LH desde células adenohipofisarias de ratas hembras. El trans-ACPD (agonista I y II) disminuyó la liberación de PRL (C: 284.7 ± 7.2 ng PRL/well; 1000 μ M: 215.6 ± 6.8 ; n=5-6; $p < 0.01$); este efecto no varió en presencia de AIDA (antagonista I). L-CCG-I (agonista II) inhibió la liberación de PRL (C: 487.9 ± 20.7 ; 100 μ M: 325.8 ± 11.3 ; 1000 μ M: 363.2 ± 23 ; n=6-7; $p < 0.01$) y la formación de AMPc. Ni el trans-ACPD ni el L-CCG-I afectaron la liberación de LH. También evaluamos el efecto del D-aspartato (D-Asp). Este neurotransmisor estimuló la liberación de PRL (C: 295.4 ± 6.4 ; 100 μ M: 358.0 ± 12.0 ; 1000 μ M: 399.2 ± 19.0 ; n=6-7; $p < 0.01$) pero no modificó la de LH. En conclusión, los agonistas metabotrópicos y D-Asp afectan la liberación de PRL pero no modifican la de LH en la adenohipofisis. La activación de los mGluRs inhibiría la secreción de PRL disminuyendo los niveles de AMPc.

178. Coexpresión de isoformas α y β del receptor estrogénico en la línea tumoral mamaria MCF-7. Paula Monje y Ricardo Boland.

*Depto. Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca.
e-mail: pmonje@criba.edu.ar*

La línea MCF-7 representa un difundido modelo para el estudio de mecanismos mediados por receptores estrogénicos (ER) nucleares. En estudios previos hemos localizado sitios ligadores de 17β -estradiol (E_2) de superficie celular asociados a la isoforma ER α . El ligado de E_2 tritiado a células enteras

pudo ser desplazado parcialmente por E_2 -BSA y E_2 -peroxidasa. Dada la naturaleza macromolecular de estos ligandos, se asume que las posibilidades de competición quedan restringidas a sitios extracelulares. Un anticuerpo que reconoce el dominio de unión de E_2 del ER α bloqueó similarmente la unión del radioligando. Paralelamente, detectamos la expresión por Western Blot de la novel isoforma ER β en MCF-7. Por inmunocitoquímica determinamos que estos receptores localizan en el núcleo celular, al igual que los ER β sobreexpresados en células COS-1 (ER negativas). Los ER β nativos fueron detectados en otras líneas celulares, como las SHM (musculares uterinas) y HeLa (epiteliales cérvix). Los resultados aportan evidencias acerca de la expresión de proteínas ER β endógenas en distintos tipos celulares. La coexpresión de las isoformas conocidas del ER, así como la localización diferencial del subtipo α en la superficie celular, adiciona complejidad a los mecanismos de acción mediados por E_2 en células MCF-7.

179. Acción del óxido nítrico sobre la síntesis de tiroglobulina. Valeria Grossoni, Pablo Nosedá, León Krawiec, Guillermo Juvenal, Mario Pisarev, Laura Bocanera.

*Unidad de Actividad Radiobiología, Centro Atómico Constituyentes, Comisión Nacional de Energía Atómica. Departamento de Bioquímica, Bioquímica, Facultad de Medicina, U.B.A. Universidad General de San Martín.
e-mail: bocanera@cnea.gov.ar*

El óxido nítrico (ON), inhibe la organificación de yodo en varias especies. Recientemente describimos un efecto inhibitorio del ON sobre la enzima responsable de este proceso, la tiroperoxidasa. Dado que la Tg es otro componente fundamental para la formación de las hormonas, se estudió el efecto del ON sobre la síntesis de esta proteína. Se usaron liberadores de ON de tiempos cortos PAPA NONOato (1 mM) y se observó su efecto sobre la expresión de Tg y los niveles de RNAm en folículos bovinos. Se usaron las técnicas de western y northern blot con un anticuerpo y sonda específicos. Los resultados muestran una inhibición de la síntesis de Tg a las 24 hs posteriores al tratamiento, (C: 2.24 ± 0.31 , ON: 0.98 ± 0.19). Una de las principales vías de acción del ON es a través de la enzima Guanilil Ciclasa (GC), en consecuencia, se investigó si el ON producía su efecto vía esta enzima. Tirocitos tratados con ON en presencia de un inhibidor de la enzima (NS2028, 1 μ M) mostraron una reversión del efecto del ON (C: 1.97 ± 0.18 , NO: 1.05 ± 0.12 , ON+Inhib.: 2.12 ± 0.31). La síntesis de RNAm se encuentra disminuida a las 6hs de tratamiento (C: 1.28 ± 0.1 , ON: 0.89 ± 0.07). Conclusiones: El ON podría modular la síntesis de hormonas tiroideas, no solo a través de la regulación de la TPO, sino también modulando la síntesis de Tg, la cual se encontraría mediada por la GC- GMPC.

180. Efecto inhibitorio de anandamida sobre la secreción de LHRH y LH. ¹Florencia Coria, ¹Claudia Mohn, ²Alejandro Lomniczi, ¹Martha Gimeno, ³Samuel McCann, ¹Valeria Rettori.

*¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos CONICET. ²Cátedra de Fisiología Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires. ³Pennington Biom. Res. Ctr, Lsu, Baton Rouge, USA
e-mail: cmohn@cefybo.edu.ar*

Se han descrito receptores cannabinoides CB₁ tanto en SNC como en adenohipofisis (AH). Recientemente se vio que la administración de un endocanabinoide, como la anandamida (AEA), disminuye los niveles plasmáticos de LH (Wenger et al, Life Sci 65:695,1999). Nos interesó determinar los posibles sitios de acción de AEA sobre la secreción de LH. Realizamos estudios in vitro incubando AH de ratas machos adultas Sprague Dawley (6-8 ratas por grupo) en presencia de AEA (10^{-5} M a 10^{-9} M). Encontramos que AEA provoca una disminución dosis dependiente de la secreción de LH siendo significativa con AEA 10^{-9} M [control (C)= 61.9 ± 9.67 ng/ ml/ 30min/ hemiAH; AEA= 27.92 ± 2.38 ; ($p < 0.05$)]. Al estimular la secreción de LH

con LHRH (4×10^{-8} M) en presencia de AEA, no hubo diferencias significativas con el grupo control. Se estudió si AEA podía inhibir la liberación de LHRH a nivel hipotalámico (HMB). Se estimuló la liberación de LHRH con ácido-N-metil-D-aspartato (NMDA 20mM) solo y en presencia de AEA (10^{-9} M). Se observó que AEA bloqueó el estímulo de NMDA [$C = 4,2 \pm 0,43$ pg LHRH/ HMB/ 30min ; NMDA= $18,18 \pm 1,68$; NMDA + AEA= $5,91 \pm 0,77$; ($p < 0.001$)]. Por todo lo anterior concluimos que AEA disminuye los niveles plasmáticos de LH tanto por acción central al intervenir probablemente con los pulsos de LHRH así como por acción directa en adenohipofisis.

181. Localización de Kv4.3, una subunidad de canales de potasio dependientes de voltaje, en la glándula pituitaria. Daniel Piserá^{ab}, Masoud Zarei^c, Gustavo Helguera^c, Adriana Seilicovich^b, Enrico Stefani^c.

^aFisiología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. ^bCentro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ^cDepartment of Anesthesiology, University of California, Los Angeles, California, USA.

Los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) cumplen un rol fundamental en la modulación de la excitabilidad celular. Están formados por proteínas que se agrupan en 6 familias (Kv1.x a Kv6.x) con varios subtipos en cada clase, formando homo o heterotetrámeros. En el presente trabajo evaluamos la expresión de Kv4.3 en la glándula pituitaria de ratas hembras mediante estudios de inmunofluorescencia con un anticuerpo específico anti-Kv4.3. Kv4.3 se expresa en algunas células del lóbulo anterior y en los lóbulos intermedio y neural. No se observó marca cuando el primer anticuerpo fue preincubado con el péptido antigénico. La inmunofluorescencia de doble marcación con anticuerpos específicos para cada una de las hormonas adenohipofisarias indicó que sólo los gonadotropos y los melanotropos expresan Kv4.3. Los terminales GABAérgicos y dopaminérgicos así como los pituicitos del lóbulo neurointermedio fueron identificados con anticuerpos específicos anti-GAD, anti-TH y anti-GFAP respectivamente. La inmunorreactividad para Kv4.3 no colocalizó con ninguno de estos marcadores. La presencia de Kv4.3 en gonadotropos, melanotropos y en terminales (presumiblemente peptidérgicos) del lóbulo neural puede explicar ciertas particularidades electrofisiológicas de estos tipos celulares.

182. Presencia del subtipo NK-2 de receptores para taquiquininas en células adenohipofisarias. Mariana Candolfi, Adriana Seilicovich, Andrea De Laurentiis, Daniel Piserá.

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.
e-mail: adyseili@fmed.uba.ar

La neuroquinina A (NKA) es una taquiquinina que posee afinidad preferencial por el subtipo de receptor NK-2. Previamente hemos demostrado que la estimulación de la secreción de prolactina inducida por NKA era bloqueada por un antagonista NK-2. En el presente trabajo, hemos estudiado la presencia de NK-2 en células adenohipofisarias de ratas machos en cultivo, a través de la unión de un antagonista específico ($[^3H]SR48968$). Aproximadamente un 30% de la unión total de $[^3H]SR48968$ fue específica. La unión específica de $[^3H]SR48968$ fue dependiente del número de células, del tiempo de incubación y de la concentración del ligando. Dicha unión alcanzó el equilibrio a los 100 min de incubación. El análisis de Scatchard de las curvas de saturación y competencia indicaron un K_d de 16.78 nM y 22.50 nM, respectivamente. La expresión de NK-2 en adenohipofisis también fue estudiada por inmunofluorescencia indirecta. Fueron detectadas células inmunorreactivas luego de la incubación en presencia de anticuerpos específicos contra el receptor. Estos resultados indican la presencia del subtipo de receptor NK-2 para taquiquininas en adenohipofisis y dan soporte a la hipótesis

de que la NKA ejerce sus efectos sobre la secreción adenohipofisaria mediante su unión a este subtipo de receptor.

ONCOLOGIA III

183. Selección de una línea tumoral (LMM3-IL) con resistencia a la citotoxicidad por óxido nítrico. Soledad Galli, María A. Jasnís, Eugenia S. de Lustig, Ana M. Eiján.

Departamento de Inmunobiología, Área Investigaciones, Instituto A. H. Roffo. Av. San Martín 5481, 1417 Buenos Aires, Argentina. Email: invroffo@fmed.uba.ar

El óxido nítrico (NO) juega un rol dual en la biología tumoral, inhibiendo o facilitando su crecimiento. La línea de adenocarcinoma mamario murino, LMM3, produce NO en condiciones basales y ésta producción puede ser inducida por LPS+INFgamma. **Objetivo:** Seleccionar una línea celular tumoral con mayor resistencia a la injuria por NO y estudiar su comportamiento biológico. **Método de selección:** 10 ciclos de inducción de NO con LPS+INFgamma. Se evaluó: a) la incidencia y velocidad de crecimiento, de las células inoculadas s.c. en la pata de ratones BALB/c, b) la capacidad de migración, mediante un ensayo de formación de una herida en monocapa y c) la capacidad de adhesión al plástico mediante, un ensayo de viabilidad celular con MTS leído a 492nm. **Resultados:** ($X \pm DS$). La línea LMM3-IL respecto a la línea parental LMM3 presentó mayor incidencia tumoral (100% vs 80%) y mayor velocidad de crecimiento (0.11 ± 0.01 mm/día vs 0.08 ± 0.05 mm/día, $n=4$). Las células LMM3-IL migran un 50% más (9 ± 3 mm/24hs vs 5 ± 3 mm/24hs, $n=9$, $p < 0.01$) y se adhieren un 25% más ($203 \pm 9 A_{492} \times 10^3$ vs $160 \pm 5 A_{492} \times 10^3$, $n=3$, $p < 0.01$) que las LMM3. **Conclusión:** Línea LMM3-IL con mayor resistencia a la citotoxicidad por NO, tiene mayor capacidad de migración y adhesión que la línea parental LMM3. La inducción de resistencia al NO generado endógenamente podría estar involucrado en un aumento de la expresión de moléculas de adhesión.

184. Papel del glipican-3 en la diseminación metastásica e invasión tumoral del adenocarcinoma mamario murino LM3. María Giselle Peters, Lucas Colombo, Eduardo Farías, Lydia Puricelli, Jorge Filmus, Elisa Bal de Kier Joffé.

Area Investigación, Instituto de Oncología "Angel H. Roffo".

El glipicano 3 (GPC3) es una glicoproteína de membrana que se expresa en tejidos embrionarios y prácticamente desaparece de los tejidos adultos. GPC3 ha sido asociado a la regulación del crecimiento y la apoptosis. Para determinar si interviene en el proceso de progresión tumoral, la línea tumoral mamaria murina LM3 fue transfectada con el gen GPC3. Las células LM3-GPC3 no difirieron de las control en su capacidad de proliferar *in vitro*, ya sea creciendo en monocapa como en baja densidad. Por otro lado, la expresión de GPC3 no modificó la capacidad de respuesta citotóxica a la Doxorubicina (IC_{50} aprox. = $0.5 \mu M$). En relación a la producción de proteasas involucradas en la invasión tumoral, las células LM3-GPC3 vieron inhibida su capacidad de secretar uPA en un 80%, mientras que no mostraron diferencias en la producción constitutiva de MMPs. Para estudiar el comportamiento *in vivo*, ratones BALB/c fueron inyectados subcutáneamente con 4×10^5 células LM3-GPC3 ($n=30$) o control ($n=20$), no observándose diferencias en la tasa de crecimiento tumoral. Sin embargo, se detectó una marcada reducción de la invasión local en los tumores LM3-GPC3. Asimismo, la incidencia de metástasis pulmonares espontáneas fue significativamente menor en los ratones portadores de tumores LM3-GPC3 (12% vs. 35% Control). Las células LM3-GPC3 presentaron además una menor capacidad metastásica en un ensayo de metástasis experimentales. Nuestros resultados indican que la reexpresión del GPC3 en células de tumo-

res mamarios puede modificar algunos procesos relacionados con el fenotipo invasivo/metastásico.

185. Actividad de metaloproteasas circulantes (MMPs) en ratone portadores de adenocarcinomas pulmonares murinos. Stella Ranuncolo, Alejandro Urtreger, Lydia Puricelli, Miriam Diament, Slobodanka Klein y Elisa Bal de Kier Joffé.

Área Investigación Instituto de Oncología «Angel H. Roffo» UBA.

e-mail: invroffo@fmed.uba.ar.

Las MMPs son enzimas multifuncionales que se asocian al fenotipo invasivo y metastásico. Nuestro objetivo fue cuantificar la actividad de MMPs en la fracción euglobulina plasmática a lo largo de la portación del tumor murino P07 y de la línea celular derivada LP07, ambos metastásicos en pulmón. Para evaluar las MMPs se empleó la técnica de zimografía cuantitativa y los resultados se correlacionaron con el comportamiento biológico de los tumores. Los ratones normales mostraron un patrón de cuatro bandas de actividad gelatinolítica de 65 kDa, 105 kDa y otras dos de 120 y 200 kDa, de aparición esporádica. Desde los estadios iniciales, los portadores de ambos tumores mostraron un aumento progresivo de la banda de 105 kDa. A los 15 días de portación la actividad MMP 105 kDa fue de $1,3 \pm 0,3$ UA/ml de plasma y $0,99 \pm 0,07$ para P07 y LP07 respectivamente (control: $0,52 \pm 0,1$ $p < 0,05$, ANOVA). A los 40 días esta actividad se incrementó alcanzando valores de $1,7 \pm 0,5$ y $1,2 \pm 0,3$ para P07 y LP07 respectivamente. El aumento en esta MMP se correlacionó con el mayor número y tamaño de las metástasis y la leucocitosis circulante. Por otro lado, la MMP de 65 kDa mostró una importante disminución en su actividad con el tiempo de portación en ambos tumores. A diferencia de los animales control, los portadores de P07 y LP07 mostraron siempre la presencia de la banda de 120 kDa. Concluimos que en P07 y LP07 la banda gelatinolítica plasmática de 105 kDa incrementa su actividad con el tiempo de portación tumoral paralelamente a la disminución de la banda de 65 kDa. Estas moléculas tendrían potencial aplicación como marcadores en adenocarcinomas pulmonares.

186. Presentación de un nuevo adenocarcinoma mamario murino con componente neuroendocrino asociado, rápida progresión y alta capacidad metastásica espontánea. Guillermo Peluffo, Victoria Muñoz Saavedra, Liliana Vauthay, Vanina Rodríguez, Miriam Diament, Slobodanka Klein.

Área Investigación, Instituto de Oncología «A.H. Roffo», Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Bioterioroffo@yahoo.com. FAX: 4580-2811

Se estudió el comportamiento clínico y el fenotipo histopatológico de un tumor de mama murino, M46, aparecido espontáneamente en una hembra BALB/c ex-reproductora de nuestro Bioterio, de 16 meses de edad. Este tumor metastatiza en pulmón y ganglios linfáticos. Se realizaron coloraciones con hematoxilina-eosina, vimentina, citoqueratina, EMA y cromogranina. Se determinó que es un adenocarcinoma infiltrante de mama, con bajo grado de diferenciación, alto índice mitótico (3/campo, 40x) y con componente neuroendocrino asociado. El tumor primario presenta escasa infiltración leucocitaria. Cuando se lo transplanta en forma s.c. en machos y hembras singéneos muestra una latencia de 5-6 días y a los 35 días de evolución el 50% de los animales mueren. A los 28 días postransplante tumoral, el 100% de los animales presentan metástasis pulmonares (124 ± 68 nódulos/pulmón). Buscando signos bioquímicos predictivos de comportamiento paraneoplásico, muestra un valor de calcemia normal al final de la evolución y leucocitosis periférica progresiva ($76 \pm 30 \times 10^3$ leucocitos/ul sangre) con un 75% de PMN. Este adenocarcinoma de mama con población neuroendocrina asociada constituye un modelo experimental con un fenotipo neoplásico poco frecuente entre tumores aparecidos espontáneamente.

Su aplicación en el campo de la biología de las metástasis surge de su rápida evolución y capacidad de diseminación. Su perfil biológico de tumor primario compuesto, permitirá profundizar el significado predictivo de la asociación simbiótica entre células epiteliales glandulares y neuroendocrinas en la glándula mamaria.

187. Análisis del comportamiento de una nueva línea celular (LM38) establecida a partir de un adenocarcinoma espontáneo mamario murino. Viviana Bumashny, Gabriel Fiszman, Alejandro Urtreger, Miriam Diament, Slobodanka Klein y Elisa Bal de Kier Joffé.

Área Investigación. Instituto de Oncología «Angel H. Roffo», UBA. vivibum@hotmail.com

El tumor M38 es un adenocarcinoma mamario murino espontáneo, papilífero bien diferenciado. Este tumor se mantiene por trasplante s.c. presentando metástasis ganglionares y pulmonares en el 88% y 100% de los animales respectivamente. El objetivo de este trabajo fue establecer la línea LM38 y caracterizar su comportamiento *in vivo* e *in vitro*. Se estudiaron repiques bajos (RB: 7-10) y altos (RA: 57-63). Mientras que los RB mostraron dos subpoblaciones, una de morfología epitelioide que expresa citoqueratina y débilmente vimentina, y otra fusiforme que expresa ambos marcadores débilmente, los RA mostraron un solo tipo celular fusiforme que expresa citoqueratina. Se observó que los RA adquirieron una mayor velocidad de crecimiento en monocapa que los RB, pero fueron incapaces de formar colonias al ser sembrados a baja densidad. Asimismo, se determinó una reducción significativa de la secreción de uPA ($10,06 \pm 2,1$ UI/mg proteína/24hs para el RB y niveles no detectables en el RA). Ratones inoculados s.c. con 2×10^5 células desarrollaron tumores con una latencia de 18 días (rango: 14-21) para los RA y 6 (rango 5-7) para los RB. El volumen tumoral alcanzado por los RB fue de $3,1 \pm 1,0$ cm³ a los 65 días con un 75% de metástasis ganglionares, mientras que en los RA el volumen fue de $0,38 \pm 0,15$ cm³ y no se encontraron ganglios metastásicos. El menor tamaño tumoral y la menor incidencia metastásica ganglionar en los RA, se correlacionan con la menor producción de uPA y menor clonogenicidad. Las variaciones encontradas entre los repiques de LM38 sugieren la selección de una subpoblación celular con un fenotipo menos agresivo.

188. Descripción de un nuevo modelo animal de Carcinoma Indiferenciado de Tiroides en Ratones Nude.¹Mabel Viaggi, ¹Alejandra Dagrosa, ¹David Gangitano, ²Carolina Belli, ²Irene Larripa, ¹Romulo Cabrini, ¹Guillermo Juvenal, ^{1,3}Mario Pisarev.

¹Dto. Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica. ²Dto. Genética, Academia Nacional de Medicina. ³Fac. de Medicina, UBA. (viaggi@cnea.gov.ar)

El carcinoma indiferenciado de tiroides (CIT) es un tumor de crecimiento rápido que da metástasis. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y caracterizar un modelo animal a partir de una línea celular humana, que permita el estudio del tumor *in vivo* para optimizar distintas terapias. Ratones NIH nude fueron implantados con células de la línea tumoral humana ARO. Se realizaron pasajes sucesivos en ratones previo cultivo del tumor. Se estudió la cinética e histología tumoral, la capacidad de generar metástasis, el tiempo de supervivencia de los ratones transplantados, la cinética de crecimiento *in vitro*, estudios citogenéticos y moleculares. El crecimiento tumoral llega a 17.000 mm³ a los 117 días. La histología en las primeras etapas de crecimiento mostró porciones viables muy extensas y vascularizadas con un índice de actividad mitótica muy alto. A los 117 días aparecieron focos metastásicos en pulmón. La cinética de crecimiento *in vitro* disminuye a medida que aumenta el número de pasajes, a pesar de la constancia en el cariotipo (Nº modal: 66 cromosomas y 6 marcadores). La amplificación de microsátelites tampoco mostró

diferencia entre la línea original y los distintos pasajes. Este trabajo permite contar con un modelo *in vivo* de CIT con iguales características que el humano para realizar estudios de terapias, mecanismos de aparición y progresión tumoral.

189. HPV y Polimorfismo de p53 en Cáncer de Próstata.

Kumiko Eiguchi, Gustavo Leirós, Carolina Sofer-Podestá, Ramiro Diz, Silvia Galliano, Inés Stella, Mario Sember, Steffen Hollmer, Elisabeth Schwarz, Tomás Kahn.

Cátedra de Bioquímica e Inmunología, Facultad de Medicina - Universidad del Salvador, Argentina. Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Alemania. (keiguchi@intramed.net.ar)

Introducción: El rol del HPV en cánceres ano-genitales es bien conocido. Sin embargo, la presencia de HPV en cáncer prostático es controvertida. Estudios publicados de polimorfismo de p53, en posición 72, mostraron una asociación entre el alelo p53Arg y cáncer de cuello uterino e infección HPV, por lo cual iniciamos un estudio en pacientes de nuestro medio con cáncer de próstata. **Objetivos:** Analizar la presencia de HPV en carcinomas e hiperplasias prostáticas y evaluar el polimorfismo de p53 en codón 72. **Métodos:** Se obtuvieron muestras de carcinomas (n=41) e hiperplasias (n=23) prostáticas por biopsia, y muestras de sangre de estos pacientes y de 23 controles sanos. La detección y tipificación de HPV fue realizada por PCR Consensus y Tipo-específica y el polimorfismo de p53 fue estudiado por PCR alelo-específica. **Resultados:** Todas las hiperplasias fueron negativas para HPV, mientras 17 carcinomas fueron HPV+ (41.4%, p<0.05), 5 de los cuales fueron HPV16+ (12.2%) y otros 2 fueron HPV11+ (4.8%). Otros 10 casos (24.4%) fueron HPV+ no tipificados. No hallamos diferencias estadísticas en las frecuencias alélicas de p53 entre carcinomas e hiperplasias prostáticas. **Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren un posible papel de HPV en la carcinogénesis prostática, sin poder detectar ninguna asociación con el polimorfismo de p53 estudiado.

190. Inserciones del virus del tumor mamario murino (MMTV) como herramienta de estudio de la progresión tumoral. Albana Gatelli, Carolina Schere-Levy, Mariana Marfil, M. Cecilia Cirio, Valeria Buggiano y Edith Kordon.

ILEX-CONICET. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

El MMTV induce tumores mamaros por mutagénesis insercional. En nuestro bioterio han hallado tres variantes nuevas que inducen tumores mamaros preñez-dependientes (HD) que progresionan hacia la hormono-independencia (HI). Nuestro propósito es utilizar las inserciones del cDNA de estas variantes virales para estudiar mecanismos de progresión tumoral. En principio, se determinó la hormono-dependencia de 17 líneas surgidas de sendos tumores primarios. Así se determinaron 9 líneas HD (incapaces de crecer en hembras vírgenes), 3 HI (crecimiento similar en vírgenes y múltiparas) y 5 HR (crecimiento mayor en vírgenes que en múltiparas). Ocho de las líneas HD y 2 de las HR han dado origen a 13 sublíneas HI. La intensidad y conservación del patrón de bandas obtenidas por análisis de Southern blot con sondas específicas para MMTV en los pasajes HI, sugieren que los mismos poseen un origen clonal. En cambio, algunos de los pasajes HD y HR no presentan bandas o las mismas son muy suaves, sugiriendo que estos tumores pueden originarse como poblaciones policlonales. Además, las variantes HI surgidas de tumores HD presentan generalmente bandas extras, lo que sugiere que, en este modelo, la progresión de HD a HI se produciría por la selección de subpoblaciones celulares determinadas y no por modificaciones epigenéticas en la población celular tumoral.

191. Efecto del tratamiento con distintos SERMs sobre útero de ratones portadores de tumores mamaros

experimentales. Andrea Actis, Cristina Rilo, Máximo Croci⁽¹⁾, Elena Rivera⁽²⁾, Rosa Bergoc⁽³⁾.

Cátedra de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina. (1)Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. mbergoc@arnet.com.ar

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de moduladores selectivos del receptor estrogénico, SERMs, sobre el útero de ratones portadores o no de tumores mamaros transplantados. Los animales se dividieron en grupos (n=10) y fueron tratados con diferentes SERMs (TAM, tamoxifeno; MPA, medroxiprogesterona; 8-CI-AMPc, análogo del AMP cíclico; RAL, raloxifeno; E2, estradiol; tratamientos combinados) y controles sin tratar. Los tratamientos se efectuaron colocando subcutáneamente pellets de liberación lenta. A su finalización se determinó en cada animal el peso uterino, contenido de receptores a estrógeno (RE) y progesterona (RP) por binding, y se observó microscópicamente cortes parafinados teñidos con hematoxilina-eosina. Los resultados fueron: el TAM disminuyó el peso del útero (p<0,01) y el contenido de RE (p<0,01), aumentó la expresión de RP (p<0,05) y produjo hiperplasia quística; el MPA aumentó el tamaño uterino (p<0,01), no presentó cambios en el contenido de RE, disminuyó la expresión de RP (p<0,01) y mostró imágenes histológicas prostaglandínicas; el 8-CI-MPc no presentó cambios significativos en ninguno de los parámetros analizados; el RAL produjo disminución del contenido de RE y peso uterino (ns); el E2, proliferación del endometrio, disminución de RE (p<0,01) y aumento de RP (p<0,01). Los resultados de los tratamientos combinados corroboraron que la plasticidad conformacional del RE en este modelo permitiría modular una respuesta diferencial según el SERM empleado.

192. Inhibición de la encapsidación viral por alteraciones de la proteína mayor de la cápside (VP-1) en tumores inducidos por virus Polioma. Norberto Sanjuan, Analía Porrás, Javier Otero, Sofía Perazzo.

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

En una comunicación previa describimos que en timomas inducidos por virus Polioma en ratones se detecta la presencia de la proteína mayor de la cápside viral VP-1, lo que indicaría replicación viral. Sin embargo, a nivel de una sola célula la replicación viral y la transformación son mutuamente excluyentes. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la naturaleza de VP-1 intratumoral y la eventual existencia de viriones en las neoplasias. Se inocularon ratones neonatos AKR con 5 x 10⁵ ufp de la cepa PTA de Polioma, mientras que un segundo grupo recibió sólo sobrenadante de cultivos celulares no infectados. 14/20 animales desarrollaron timomas entre 9-12 semanas post-infección (pi). Los tumores fueron estudiados por inmunocitoquímica, microscopía electrónica, inmunomicroscopía electrónica y aislamiento viral. La caracterización de VP-1 se realizó por SDS-PAGE y western blot, comparando muestras provenientes de timomas con otras obtenidas de tejidos infectados en forma productiva. Se observó que la mayor parte de las células positivas para VP-1 carecen de partículas virales, y que VP-1 de los timomas migra electrofóreticamente más lejos que VP-1 de tejidos infectados, sólo cuando es extraída con inhibidores de fosfatasa. Se postula que cambios post-traduccionales en VP-1 (probablemente hipofosforilación) impide el ensamblaje de Polioma en los tumores.

193. Prevalencia de infección por HPV en Concordia, Argentina: estudio con base poblacional. Elena Matos², Dora Loria², Gustavo Amestoy², Lily Herrera³, Miguel Prince³, Juan Moreno³, Cristina Krunfly³, Jan Walboomers⁴, Chris Meijers⁴, Nubia Muñoz⁵, Rolando Herrero⁵ y grupo colaborativo "Proyecto Concordia".

¹Instituto Roffo, UBA; ²CEMIC, Buenos Aires, ³Hospital Felipe Heras, Concordia; ⁴Free Univ Hosp Amsterdam, The Netherlands; ⁵IARC, Lyon, Francia e Instituto del Cáncer de Costa Rica (presentado por: María del Carmen Vidal). e-mail: matos@fmed.uba.ar

El estudio se realizó en el marco del proyecto de la IARC, que investiga la epidemiología de la infección por HPV en diferentes poblaciones. Concordia presenta una tasa de incidencia anual de cáncer de cervix invasor, ajustada por edad, de 32/100,000. El INDEC proporcionó una muestra aleatoria de 1786 hogares, estratificada por nivel socioeconómico. Se invitó a las mujeres mayores de 14 años, residentes en dichos hogares, a concurrir a una entrevista y un examen ginecológico, incluyendo Pap, colposcopia, recolección de células exfoliadas del cuello uterino y sangre. La detección de DNA de HPV se realizó con PCR utilizando como primer el GP5+/6+. Se realizó PCR en 999 mujeres sobre 1028 incluídas. La prevalencia de ADN de HPV en mujeres sexualmente activas fue de 17,7%, con un pico máximo de 25% en mujeres menores de 25, para disminuir con la edad hasta el 9% en mayores de 64 años. Los tipos más comunes fueron HPV 16 (3,8%) y 35 (2,1%). Las mujeres más jóvenes tuvieron una iniciación sexual mucho más temprana y mayor número de parejas sexuales. Factores de riesgo significativos para la detección de HPV, en un modelo multivariado, fueron: menor edad, bajo nivel socioeconómico, aumento del número de parejas sexuales, diagnóstico citológico de alto grado, presencia de flujo y el no usar contraceptivos orales.

194. Expresión de PDGF-R, DCC, MDM2 y p16 en gliomas de distinto grado histológico. Mirta Varela, Stella Ranuncolo, Ana Morandi, Elisa Bal de Kier Joffé, Guadalupe Pallotta, Lydia Puricelli.

Area Investigación, Instituto de Oncología «Angel H. Roffo», Universidad de Buenos Aires. Servicio de Oncología Clínica, Hospital Italiano de Buenos Aires. e-mail: lydiapur@fmed.uba.ar

Los gliomas son muy agresivos y prácticamente incurables. Alteraciones en la expresión de los protooncogenes PDGF-R (alfa) y MDM2, y de los supresores p16 y DCC se han vinculado con la progresión tumoral. Se estudió, mediante IHQ, la expresión de estas moléculas en 41 gliomas de diferente grado de malignidad [Bajo grado (ABG), Anaplásico (AA) y Glioblastoma Multiforme (GBM)]. Se observó una alta expresión de PDGF-R (>50% de cél.+) asociada a un mayor grado histológico (40% de GBM vs 15% de ABG y AA, NS). Sólo pocos casos mostraron sobreexpresión de MDM2, similar en todos los tipos de gliomas. Sólo el 11% de los GBM perdió la expresión del supresor DCC. Por otro lado, se observó una asociación entre la pérdida de expresión del inhibidor de ciclinas p16 y el grado histológico (ABG: 0%, AA: 12% y GBM: 26%, p<0.05), resultado que no fue alterado por las covariables edad, sexo y Karnofsky. Sólo la expresión de p16 se asoció con sobrevida global. El 53% de los gliomas de pacientes con sobrevida <1 año no expresan p16, mientras que sólo lo pierden el 22% de los que sobreviven mayor tiempo (p<0.05). En conclusión la asociación entre la pérdida de expresión de p16 y el alto grado de malignidad fue independiente de otras variables de pronóstico estudiadas. Además, la falta de expresión de p16 se asoció con menor sobrevida.

INMUNOLOGIA III

195. Efecto del cortisol (CORT) y la dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la respuesta proliferativa in vitro a sonicated de M.tuberculosis (ST) en individuos sensibilizados a micobacterias. Carolina Mahuad, Laura Vietti, María L. Bay, Oscar Bottasso.

Instituto de Inmunología, Fac. de Cs. Médicas UNR. e-mail: Bottasso@arnet.com.ar

Dado las potenciales influencias de los glucocorticoides y la DHEA (su antagonista fisiológico) sobre la funcionalidad de las células T murinas, se analizó el efecto del CORT y la DHEA sobre la respuesta proliferativa hacia ST en humanos conocidos como respondedores a dicho estímulo. Se efectuaron cultivos en paralelo de células periféricas mononucleares de 15 personas sanas calmetizadas (37±12 años, media±ds) durante 2 y 5 días estimuladas con dosis óptimas de ST en presencia (o no) de CORT, corticosterona o DHEA (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻¹⁰, 10⁻¹² M). Se muestran resultados representativos del 5to día (cpm cultivo ST+hormona/cpm cultivo ST x 100): 10⁻⁵ M CORT 23±9.4, DHEA 73±15 (p<0.001); 10⁻⁶ M CORT 29±11, DHEA 84±23 (p<0.001); 10⁻⁸ M CORT 90±14, DHEA 92±16 (ns); 10⁻¹⁰ M CORT 22.5±13, DHEA 89±25 (p<0.0001); 10⁻¹² M CORT 33±13, DHEA 81±19 (p<0.001). La corticosterona (cuyos niveles circulantes en humanos son 7 veces inferiores al CORT) mostró un comportamiento similar a este último. La inhibición por glucocorticoides a las 48 hs fue similar a la del 5 día. El alcohol utilizado para la disolución de las hormonas no afectó la proliferación. La inhibición de la blastogénesis por los glucocorticoides se visualiza para las concentraciones de 10⁻¹⁰ M y 10⁻⁵⁻⁶ M. Ello podría tener relevancia en los mecanismos de regulación extrínsecos de la respuesta inmune.

196. Producción de citoquinas (Cks) por subpoblaciones linfocitarias de pacientes con tuberculosis pulmonar (TB). Marta Finiasz, Susana Fink, Cecilia Proietti, Clara Franco, Juan Ilarregui, Claudia Borghetti, Eduardo Abbate, María Sasiain.

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina y Neumología Hospital Muñiz, Buenos Aires. (icolasbe@interserver.com.ar)

Un mecanismo clave por el cual los linfocitos T responden a los agentes infecciosos es la secreción temprana de Cks, tales como IFN γ y TNF α por las células Tgd y NK. Se evaluó la producción de Cks intracitoplasmáticas (ic) de células Tgd y NK, así como la producción total de IFN γ y TNF α de células mononucleares de sangre periférica (CMP) de 10 pacientes con TB avanzada (TBa), 5 con TB moderada (TBm) y 20 controles normales (N). Las CMP se aislaron de un gradiente de Ficoll-Hypaque y se incubaron con PMA (5ng/ml), Ionomicina (1uM) y Monensina (3uM) durante 4-6 hs. Las células se marcaron con anticuerpos conjugados para identificar las poblaciones celulares y con anti Cks luego de fijadas y permeabilizadas y se analizaron por citometría. %Tgd: TBa: 2,1±1,2, TBm: 9,2±3,1, N: 2,9±0,6, TBm vs N (p<0,05), TBa vs TBm (p<0,05); %CD56: TBa: 12,9±5,5, TBm:12,6±2,2, N:8,1±1,2, % IFN γ total: TBa:14,1±2,0, TBm:29,7±4,7, N:21,2±1,0, TBa vs TBm (p<0,05), TBa vs N (p<0,05); %TNF α total: TBa: 18,7±5,5, TBm: 21,0±1,9, N: 14,8±2,6; %IFN γ por Tgd: TBa: 1,3±0,6, TBm: 5,7±2,7, N: 2,1±0,7; TBa vs TBm (p<0,05); % IFN γ por CD56: TBa:2,1±0,8, TBm: 6,4±1,5, N: 1,7±0,6, TBm vs TBa (p<0,05). No se observan diferencias en los valores de TNF α . La pérdida de Tgd y una menor producción de IFN γ por las CD56 contribuirían al descenso del IFN γ ic observado en las CMP de los TBa. Esto podría explicar el marcado deterioro de la respuesta inmune con el progreso de la enfermedad.

197. Funcionalidad de los neutrófilos de pacientes con tuberculosis. Influencia del compromiso pulmonar y tratamiento específico. Gladys Fiorenza, Oscar Bottasso, Miguel Farroni, Diana Dlugovitzky.

Cat. de Microbiología e Inst.de Inmunología, Fac. Cs. Médicas de Rosario. e-mail: schenquer@yahoo.com

Se investigó si la actividad fagocítica (AF) y el estallido respiratorio (ER) de los neutrófilos (PMN) de pacientes con tuberculosis (TB) se relacionaban con la severidad del daño pulmonar o la administración de tratamiento antibacilar. Se estudiaron 12 controles sanos y 57 pacientes con TB (media general 36±14 -ds- años); 13 de estos últimos HIV+, y los 44 HIV negativos distribuidos en leve/moderado (LE-MO, n=21) y

avanzados (AV, n=23); 30 de ellos en tratamiento (LE-MO 14, AV 10, HIV+ 6). La AF y el ER se estudió por citometría de flujo. **AF** (sangre heparinizada incubada con *Candida albicans* opsonizada con suero normal y conjugada con fluoresceína, media±ds): Controles 76±9.1, *no tratados* LE-MO 75.3±11.4, AV 73.1±12.7, HIV+ 77±19.8 (ns); *tratados* LE-MO 83.3±21, AV 75.2±14.2, HIV+ 87±9 (tratados vs no tratados en LE/MO, p<0.04). **ER** (PMN tratados con dehidrorhodamina-123 y posterior estimulación con forbol miristato acetato): Controles 69.8±44.7, *no tratados* LE-MO 70.6±72, AV 36.8±43.3, HIV+ 4.8±4 (Controles vs resto p<0.001, HIV+ vs Grave y LE/MO, p<0.002); *tratados* LE-MO 91.1±74.7, AV 66.2±51.6, HIV+ 9.9±6.1 (p<0.006 HIV+ vs resto); las comparaciones tratados vs no tratados, p<0.01 para cada uno de los grupos. La afectación en la funcionalidad de los PMN es más pronunciada en los HIV+ quienes tras el tratamiento denotan una recuperación muy inferior a la observada en los demás casos.

198. Secreción de TNF α e IL-1b asociado a la expresión de TNF-R55 en neutrófilos (PMN) en tuberculosis pulmonar activa (TB). Mercedes Alemán, Macarena Beigier, Claudia Borghetti, Silvia de la Barrera, Eduardo Abbate, Martín Isturiz, María Sasiain.

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina y Neumología Hospital Muñiz, Buenos Aires (jjarellano@intramed.net.ar)

En tuberculosis el influjo de los PMN al sitio de inflamación es un evento temprano donde la secreción de citoquinas (CK) proinflamatorias tales como TNF α e IL-1b contribuyen a la injuria tisular y al reclutamiento de los PMN. Anteriormente encontramos elevada la expresión de Fc γ Rs (CD16 y CD64) así como funciones que estos median (citotoxicidad, estallido respiratorio) en PMN periféricos de pacientes con TB respecto de individuos normales (N). Ya que estas son funciones inducidas por TNF α e IL-1b y mediadas por receptores para TNF α (TNF-R), evaluamos en TB (n=15) y N (n=12), la producción de estas CK en respuesta a LPS y *M. tuberculosis* (Mt) y la expresión de TNF-R. PMN aislados de sangre periférica, se incubaron 18h con LPS (1 μ g/ml) o Mt (1x10⁶ bac/ml) y se determinaron CK en sobrenadante (ELISA). La expresión de TNF-R55 y TNF-R75, se midió por citometría de flujo, como % de intensidad media de fluorescencia respecto del N (%MIF). **TNF α control:** [TB:360±51; N:276±95 pg/ml]; **LPS:** [TB:684±92; N:357±88pg/ml] (p<0.05); **Mt:** [TB:469±107, N:265±45pg/ml] (p<0.05). **IL-1b control:** [TB:131±50, N:45±13 pg/ml] (p<0.05); **LPS:** [TB:625±101, N:321±35 pg/ml] (p<0.009). **Mt:** [TB:258±117, N:273±43 pg/ml]. % **MIF TNF-R55:** TB:188±34 (p<0.02). En TB los PMN contribuyen a la inflamación sistémica secretando CK proinflamatorias lejos del sitio de infección asociado a una mayor expresión de TNF-R55, que explicaría la activación mediada por TNF α .

199. Estimulación con sonicado de *M. tuberculosis* (ST) en células periféricas mononucleares (CPM) de pacientes con artritis reumatoidea (AR). II. Relación entre los niveles de citocinas anti y proinflamatorias. Flavia Rondelli, Mario Goñi, Bernardo Pons-Estel, Alberto Gentiletti, Oscar Bottasso, María Bay.

Inst. Inmunol. Fac.Cs. Médicas UNR, E-mail bay.mahuad@mailcity.com

Estudios previos indican que pacientes con AR sin tratamiento inmunosupresor presentan una baja blastogénesis al estimular sus CPM con antígenos micobacterianos, acompañada con niveles descendidos de IFN-g, FNT- α e IL-10 y un aumento del TGF- β en los sobrenadantes de cultivo. El presente trabajo analiza la relación, de a pares, entre dichas citocinas para una mejor caracterización de los desbalances existentes a este nivel. El análisis corresponde a los datos de los cultivos (4 días) estimulados con ST o no (NE), de 29 pacientes con AR y 27 controles (Co). TGF- β /IFN-g, NE Co

652±119 (media \pm es), AR 770±90 (ns), ST Co 153±75 AR 372±105 (p=0.05); TGF- β /FNT- α , NE Co 273±74 AR 734±151 (p=0.03), ST Co 12±3 AR 39±8 (p<0.03); TGF- β /IL-10, NE Co 1079±175 AR 1311±187 (ns), ST Co 78±17 AR 277±85 (p<0.05); TGF- β /IL-6, NE Co 12±5 AR 71±32 (p=0.05) ST Co 0.2±0.02, AR 0.35±0.05 (p<0.025). Para los demás análisis, la relación IL-10/FNT- α fue más alta en los AR respecto de los Co (p<0.03). La relación entre los niveles de citocinas de los pacientes AR denota un predominio de TGF- β sobre mediadores proinflamatorios y aún sobre la IL-10. En algunos casos, ello ya se visualiza en los cultivos NE lo que sugeriría un distinto tipo de regulación desde el inicio, más evidente tras el estímulo con ST.

200. Estimulación con sonicado de *M. tuberculosis* (ST) en células periféricas mononucleares (CPM) de pacientes con artritis reumatoidea (AR). I. Niveles de citocinas en los sobrenadantes de cultivo. Flavia Rondelli, Mario Goñi, Bernardo Pons-Estel, Alberto Gentiletti, Oscar Bottasso, María L. Bay.

Inst. Inmunol. Fac. Cs. Médicas UNR; e-mail: bay.mahuad@mailcity.com

En el análisis de la influencia del contacto con micobacterias medioambientales sobre la respuesta autoinmune, previamente se demostró que los pacientes con AR denotaban una baja blastogénesis al estimular sus CPM con una amplia gama de antígenos (Ags) micobacterianos. Para determinar si ello se relaciona con cambios en los niveles de citocinas, se dosaron las concentraciones de IFN- γ , FNT- α , IL-6, IL-10 y TGF- β (ELISA-R&D) en sobrenadantes de cultivos de 4 días, estimulados con un Ag representativo como el ST. Se estudiaron 29 pacientes con AR sin terapia inmunosupresora y 27 controles (Co) similares en sexo y edad (media 46.3±12.5 años). **Resultados** (ej.: cultivos estimulados pg/ml, media \pm es): IFN- γ Co 294±66, AR 144±47 (p<0.02), FNT- α Co 608±75, AR 366±52 (p=0.005), IL-6 (ng/ml) Co 2.7±2, AR 25±2 (ns), IL-10 Co 119±31, AR 56±8 (p<0.05), TGF- β Co 5355±600, AR 7126±810 (p=0.05). El único mediador que se correlacionó con la blastogénesis fue el IFN- γ : Co (r=0.59, p<0.01), AR (r=0.57, p<0.01). La baja respuesta proliferativa a micobacterias en AR se acompaña de un descenso en los niveles de IFN- γ , FNT- α e IL-10, y no así el TGF- β que tiende a aumentar. Ello explicaría en parte los resultados obtenidos dado los efectos moduladores (en menos) de esta última citocina.

201. Niveles séricos de factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), factor transformante de crecimiento beta (TGF- β) y nitritos en pacientes con tuberculosis pulmonar (TB). Diana Dlugovitzky, Gladys Fiorenza, Liliana Rateni, Florencia Prieto, Miguel Farroni, Oscar Bottasso.

Cat. Microbiología, Inst. Inmunología, Fac. Cs. Médicas UNR. e-mail: schenquer@yahoo.com

Dado el papel del TGF- β , el FNT- α y el óxido nítrico (NO) en la resistencia a la infección con micobacterias y la interrelación que a su vez existe entre la producción de estos mediadores, se evaluaron los niveles séricos de los mismos en pacientes con TB de distinta severidad. Se estudiaron 29 enfermos sin tratar (Leve-Moderados - LE-MO- 10 y Avanzados -AVAN- 19) y 10 controles (Co) que no diferían significativamente en edad y sexo (31±15 años, media \pm es). Las citocinas se midieron por ELISA (R&D) y los nitritos (como estimador de NO) por la reacción de Griess previa reducción con nitrato reductasa. **Resultados** (media \pm es) TGF- β (ng/ml) Co 35.9±1.7 LE-MO 39.7±4.4 AVAN 54.3±3.9 (AVAN vs resto, p<0.01; FNT- α (pg/ml) Co 13.3±2.4 LE-MO 19.4±3.3 AVAN 33.3±4.3 (AVAN vs resto, p<0.01); Nitritos (μ moles/ml) Co 252.7±38.3 LE-MO 190.8±26.3 AVAN 76.1±20.9 (AVAN vs resto, p<0.001). Se detectó una correlación significativa entre TGF- β y FNT- α (R=0.44, p<0.01), como así también entre FNT- α y nitratos (R=-0.44, p<0.01). La TB agravada se acompaña de una mayor

presencia en circulación de TGF- β y FNT- α con una caída en los metabolitos derivados del NO. La asociación negativa entre nitritos y FNT- α sería atribuible a interrelaciones con otros factores presentes a nivel local y/o sistémico.

202. Expresión diferencial de receptores para interleuquina 9 (IL-9) en células de pacientes con lepra y controles normales. Susana Fink, Marta Finiasz, Clara Franco, María Sasiain, Silvia de la Barrera, María Fariña, Graciela Pizzariello, Jacques van Snick, Jean Renaud.

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina; Dermatología, Hospital Muñiz y Université de Louvain, Bruselas, Bélgica.

Anteriormente hemos observado diferencias en la actividad citotóxica de células mononucleares periféricas (CMP) obtenidas de pacientes con lepra (P) e individuos normales (N) en presencia de una o más citoquinas. La IL-9 es una citoquina con actividad biológica sobre células hematopoyéticas y del sistema inmune. Al estudiar su efecto sobre la generación de actividad citotóxica (Cx) T contra macrófagos autólogos estimulados con *Mycobacterium leprae*, se obtuvo un incremento de ésta en CMP de N que no se observó en las de P, independientemente de la forma clínica (%Cx N:21.31 \pm 1.64, N+IL-9:25.31 \pm 1.85 (n=16), p<.05 P:12.73 \pm 1.94, P+IL-9: 12.67 \pm 2.09 (n=15). El efecto de la IL-9 es específico ya que se inhibe con un anticuerpo monoclonal anti-receptor para IL-9 (a-IL-9R). Para ver si la respuesta diferencial de P y N se relaciona a una diferencia en la expresión de receptores para IL-9 se estimularon las CMP de 6 N y 7 P con PMA-ionicina durante 4 h y se marcaron en forma indirecta con a- IL9R y FITC. Se observó en los N un incremento en el porcentaje de células marcadas que no se obtuvo en los P (% células N C: 0.38 \pm , 0.31, E: 1.62 \pm 0.92, p<.05, P: C: 0.09 \pm 0.05, E: 0.07 \pm 0.06). Estos datos sugieren que el efecto diferencial observado puede deberse a una expresión mayor de IL-9R en los N.

203. Autoanticuerpos anti-galectina-1 en la infección humana por *Trypanosoma cruzi*: Expresión diferencial de esta proteína que une β -galactósido en la enfermedad de Chagas cardíaca. Laura Giordanengo, Susana Gea, *Gustavo Barbieri, **Gabriel A Rabinovich.

*Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba; * Centro de Enfermedad de Chagas y Patología Regional, Santiago del Estero; ** Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Buenos Aires, Argentina. (e-mail: gabyrabi@ciudad.com.ar)*

Galectina-1, proteína que se une a β -galactósido, se localiza en tejido cardíaco humano y juega un papel clave en procesos inmunológicos e inflamatorios. Se determinaron autoanticuerpos contra Gal-1 recombinante humana (rGal-1) por ELISA y Western blot en sueros de pacientes en el estadio agudo (EChA) y crónico (EChC) de la enfermedad de Chagas, estos últimos clasificados como GI, GII y GIII según la severidad de daño cardíaco. Los resultados se compararon con controles sero- negativos. Se detectaron Acs IgM anti-rGal-1 en el 57,1% de los sueros de pacientes EChA (p=0,004) y en 25,0%, 19,0% y 0% de pacientes EChC de los grupos I, II y III respectivamente. Acs IgE anti-rGal-1 se hallaron en el 90,5% de pacientes EChA (p<0,0001), mientras los pacientes EChC no presentaron este isotipo específico. Acs IgG anti-rGal-1 se detectaron en 42,8% de pacientes EChC del GIII (p=0,024), siendo positivas 25,0% y 9,5% de muestras del GII y GI respectivamente. Sólo un 9,5% de sueros de pacientes EChA resultaron positivos. No se detectó reactividad de IgG ni IgM contra rGal-1 en otras cardiomiopatías. No se encontraron estructuras tipo Gal-1 en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. La expresión de Gal-1 aumentó en tejido cardíaco de pacientes EChC en comparación con el tejido cardíaco de individuos

normales. La autoreactividad detectada en pacientes con enfermedad de Chagas contribuye a la ya reportada respuesta autoinmune hacia diversos componentes propios.

204. Galectina-1 producida por células B activadas controla la sobrevivencia de una subpoblación de células T. Elina I. Zúñiga, Gabriel A. Rabinovich, Mercedes Iglesias & Adriana Gruppi.

Depto de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC & Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. UBA. agruppi@bioclin.fcq.unc.edu.ar

En el presente estudio, investigamos la expresión y función biológica de Galectina-1 (Gal-1) de linfocitos (Li) B purificados de bazo de ratones infectados (RI) con 500 tripomastigotes de *T. cruzi* (15 días postinfección). LiB de ratones normales (RN) fueron utilizados como control. La expresión de Gal-1 se estudió por western blot y FACS, utilizando un Ac específico para Gal-1. Observamos que Gal-1 se expresa en LiB de RI, que presentan un alto grado de activación, localizándose principalmente en el compartimento citosólico. La expresión de Gal-1 fue regulada positivamente en LiB de RN por LPS, F(ab)₂ anti-CD40, detectándose la máxima expresión frente al entrecruzamiento simultáneo del BCR y CD40. Bajo esta estimulación Gal-1 también se detectó en los sobrenadantes de cultivo. Posteriormente Gal-1 fue purificada de LiB de RI por cromatografía en una matriz de agaros-lactosa. Por SDS-PAGE observamos que la fracción eluida con DEPBS + lactosa 100 mM contenía las formas mono- y diméricas de Gal-1. Por FACS, con yoduro de propidio, observamos que Gal-1 purificada de LiB no afecta el umbral de muerte de otros LiB sino que induce apoptosis de LiT (LiT activados: 7% de apoptosis; LiT activados+Gal-1:24%). Además, Gal-1 inhibió en un 60% la secreción de IFN γ pero no la de IL-2 e IL-10. Los resultados sugieren que LiB activados vía BCR-CD40 por Acs de microorganismos expresan Gal-1 la cual elimina LiT secretantes de IFN γ pero no LiT cooperadores de la respuesta humoral.

205. Galectina-1 modula en forma bifásica la actividad del macrófago en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. Elina I. Zúñiga, Adriana Gruppi & Gabriel A. Rabinovich

Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba & Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires

La regulación de los mecanismos de apoptosis del macrófago (MO) es un factor crítico en las interacciones parásito-huesped durante la infección por *T. cruzi*. Recientemente, demostramos que galectina-1 (Gal-1), posee propiedades inmunoregulatorias específicas. En el presente estudio investigamos la función y expresión de esta proteína a nivel de MO durante la infección experimental por *T. cruzi*. A los 15 días post-infección de ratones BALBc infectados con 500 tripomastigotes, se purificaron MO obteniendo un 90% de células Mac-1+. La exposición de MO a Gal-1 0.04 μ g/ml incrementó la replicación del parásito, mientras que Gal-1 0.4 y 4 μ g/ml redujo en forma dosis-dependiente los niveles de parásitos (p<0.05). Esta disminución fue acompañada por cambios morfológicos característicos de apoptosis. Estos cambios se correlacionaron con un incremento en los niveles de hipodiploidía (39 y 49% para Gal-1 0.4 y 4 μ g/ml respectivamente). MO expuestos a 0.04 μ g/ml de Gal-1 no modificaron sus niveles de apoptosis, mientras que produjeron niveles menores de IL-12 y óxido nítrico y niveles normales de IL-10, respecto a MO controles. Finalmente, por Western blot y RT-PCR se observó un incremento de Gal-1 en MO de animales infectados, respecto a MO de ratones normales. Este incremento se confirmó en una línea celular de MO (J774) infecta-

da *in vitro*. El presente estudio es la primer evidencia acerca de la participación de Gal-1 en una infección, modulando en concentraciones fisiológicas el equilibrio de citoquinas que regulan la eliminación del parásito y destruyendo en concentraciones críticas a la célula huésped.

206. Expansión de células NKT en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. Rita L. Cardoni, María Inés Antúnez.

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. M. Fatała Chabén" ANLIS, Bs. As. (RLCardoni@yahoo.com)

Las células que expresan en su superficie marcadores de células NK y de linfocitos T, NKT, podrían participar en el reconocimiento de antígenos no protéicos asociados a moléculas CD1 de las células presentadoras de antígenos y regular la respuesta inmune a través de la liberación de IFN- γ y/o IL-4. Estudiamos por citometría de flujo la expresión del TCR $\alpha\beta$, CD4 y DX5 (Pan NK) en la población no-adherente del bazo de ratones BALB/c y C3H infectados con *T. cruzi*, cepa Tulahuén. Encontramos un incremento significativo en el porcentaje de células NK en la población TCR $\alpha\beta$ a los 18 días post-infección: BALB/c Normales: 2.4 ± 0.4 , Infectados: 8 ± 1 ; C3H Normales: 3.6 ± 0.6 , Infectados: 7 ± 1 . La población CD4+DX5+ alcanzó niveles similares a los de las células TCR $\alpha\beta$ +DX5+. En los animales infectados, un 20% de las células NK expresaron el TCR $\alpha\beta$. El número de células NKT en el bazo aumentó unas 6 y 3 veces en la cepa BALB/c y C3H respectivamente. En la etapa crónica de la infección, sólo los ratones BALB/c presentaron un mayor número de células TCR $\alpha\beta$ +DX5+ respecto de sus controles. Los resultados indican la expansión de células NKT en el bazo de ratones infectados con *T. cruzi*. Financiación: CONICET y FONCYT PICT 5-139-2330.

207. Efecto de la infección materna por *Trypanosoma cruzi* sobre la respuesta inmune humoral de la cría. Héctor Dávila¹, Pablo López Bergami², Mariano Levin², Nora Puig¹.

¹Inst. Inmunología, Fac. Cs. Médicas, U.N.R. Rosario (Sta Fe) ²Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET), Buenos Aires.
e-mail: Davila@mailcity.com

La infección experimental por *Trypanosoma cruzi* (T.c) en la rata durante la gestación produce efectos reguladores sobre la respuesta inmune de la cría. Se estudió la respuesta de anticuerpos hacia distintos antígenos del T.c en hijos de madres infectadas o no durante la gestación. Grupos: normales (G1 n=5), infectados hijos de madre normales (G2 n=5), e infectados hijos de madres infectadas durante la gestación (G3 n=6). Las crías fueron infectadas con un millón de Tc al destete. A los 60 días post-infección se estudió la respuesta a la proteína recombinante P2beta de Tc (S23) y contra el péptido R13 que corresponde a los 13 aminoácidos del extremo C terminal de la proteína ribosomal del parásito. También se determinó la reactividad contra el péptido PO15 que corresponde al extremo C terminal de la proteína ribosomal PO de Tc. La reactividad se midió por ensayo de ELISA. Registramos diferencias en la proporción de respuestas mayores que la mediana (G de Sokal): **S23**, G1: 0/5, G2: 0/5, G3: 3/6 p<0.001. G2 vs G3 (p<0.05). **R13** G1 0/5, G2 0/5, G3 3/6. p<0.001. G2 vs G3 (ns). **PO15** G1 0/5, G2 2/5, G3 4/6 p<0.05. G2 vs G3 (ns). Conclusiones: los animales infectados reconocen distintos Ag. del Tc. Los infectados hijos de madres infectadas difieren de los infectados hijos de madres normales en el reconocimiento del péptido S23, por lo que éste sería un Ag. modulado por la infección materna.

208. Obtención de un anticuerpo monoclonal contra la proteína ribosomal P2b. Clonado y caracterización de sus regiones variables. Pablo López Bergami, Pablo Mateos, Mariano Levin y Alberto Baldi.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME),

*Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI). Buenos Aires, Argentina.
e-mail: pbergami@dna.uba.ar*

La proteína ribosomal P2b de *Trypanosoma cruzi* (TcP2b) es un antígeno relevante en la cardiopatía chagásica crónica. Los anticuerpos contra el epitope C-terminal de TcP2b (R13) poseen características autorreactivas ya que también reaccionan (con menor afinidad) contra el péptido H13 correspondiente a la proteína homóloga humana. Con el fin de ahondar en el estudio de las propiedades autorreactivas de estos anticuerpos el objetivo de este trabajo fue obtener un anticuerpo monoclonal (AM) contra la región conservada entre R13 y H13. Para ello se inmunizaron ratones Balb/c con MBP-TcP2b y mediante ensayos de ELISA y Western blot contra GST-TcP2b y GST-MmP (proteína ribosomal P de ratón) y los péptidos R13 y H13 se seleccionaron ratones con el perfil serológico deseado. Luego de fusionar esplenocitos provenientes de estos ratones con células de mieloma, se estudió la reactividad de 500 clones contra R13 y H13. Finalmente se seleccionó el clon B10, el cual posee la misma afinidad por ambos péptidos. Este perfil de reactividad fue semejante al de los autoanticuerpos anti-P de pacientes lúpicos. Las regiones variables de la cadena pesada y liviana del anticuerpo monoclonal fueron amplificadas por PCR, secuenciadas y clonadas bajo la forma de un fragmento variable de cadena simple (scFv).

209. Efectos inmunomodulantes de los metales pesados. La producción de óxido nítrico en macrófagos. Dario Ramirez*, Micalizzi, Blas*, y Gimenez, Sofía.

Laboratorio de Bioquímica, Molecular-Proyecto 8104 - CONICET y Cátedra de Inmunología. Universidad Nacional de San Luis. San Luis - 5700- Argentina.
e-mail: dramirez@unsl.edu.ar*

Los macrófagos son células centrales en el control de la respuesta inmuno-inflamatoria. Se estudió el efecto de diferentes dosis de metales pesados (Mp) (*in vitro*) sobre la viabilidad, la liberación de glutatión reducido (GSH, nmoles /10⁶células) y la producción de óxido nítrico (NO, μ M) en monocapas de macrófagos peritoneales de ratón (MPR). Se observó una significativa (p<0.05) pérdida de la viabilidad celular, luego de 24 hs de incubación, cuando la dosis de Pb (II), Cd(II), Cr(IV), Hg (II) y As (III) fue de 1, 2, 10, 2, y 2 μ M respectivamente, respecto de los cultivos sin Mp. Asimismo, se evaluó el efecto de una dosis de Mp igual a 1 μ M durante 24 hs sobre la producción de NO y liberación de GSH. Cd, As y Cr indujeron un incremento de 5, 6 y 3 veces respectivamente, en la producción de NO. Por otro lado, As inhibe la producción de NO inducida por lipopolisacárido (1 μ g/ml), por un éster de forbol (PMA 200nM) y por zimosan opsonizado (ZO, 10 μ g/ml) luego de 24 hs de cultivo. Cd, Cr o Hg estimulan la producción de NO activada por ZO. Cd, Cr y As inducen la liberación de GSH, la cual fue estimulada, para los tres metales, en una segunda incubación con PMA. As inhibe la liberación de GSH inducida por ZO. El estrés oxidativo inducido por los Mp podría ser un mecanismo importante para explicar sus efectos inmunomodulantes.

210. Expresión de genes inducidos por IL-10 en macrófagos. Rita Stumpo, Manfred Kauer, Stephan Martin and Hubert Kolb.

*Diabetes Research Institute at the Heinrich-Heine University of Duesseldorf, Germany.
e-mail: rstumpo@ffyb.uba.ar*

Se ha descripto que la interleuquina 10 (IL-10) disminuye respuestas proinflamatorias en macrófagos. Además, IL-10 comparte -con otras citoquinas del tipo Th2- un efecto antagónico de IFN- γ y supresor de la activación de células Th1 por parte de las células presentadoras. En este trabajo evaluamos si IL-10 puede inducir en macrófagos murinos en cultivo (A-J774)

estados de reactividad alternativa al ya conocido efecto supresor. Para ello se realizó una búsqueda sistemática de genes inducidos por IL-10, empleando hibridación substractiva por supresión (SSH). Se obtuvieron inicialmente 1300 clones, que fueron evaluados por southern-blot y dot-blot como primer paso de selección. Se identificaron 51 clones cuya expresión demostró estar aumentada en respuesta al estímulo con IL-10. 41/51 mostraron homología (>95%) con genes implicados en el metabolismo celular o en la inmunoregulación, 5/51 resultaron ser secuencias noveles, y los restantes 5 presentaron alta homología con ESTs de función conocida. Uno de los hallazgos más importantes fue que el 25% de los genes expresados en respuesta a IL-10 también lo hicieron en respuesta a IFN- γ . Un subgrupo de ellos se expresó además frente al estímulo con IL-4 y/o IL-5. El 57% del patrón de genes inducidos por IL-10 fueron expresados adicionalmente en respuesta a IL-5. En síntesis, la expresión de genes en macrófagos inducida por IL-10 es parcialmente diferente a la expresada por IL-5 y es distinta de la producida por IL-4, lo que sugiere una inesperada diversidad en la expresión de genes por diferentes citoquinas del tipo Th2.

211. Mifepristone (RU 486) revierte la inmunosupresión inducida por lipopolisacáridos (LPS). Luis Mari, Fernanda Alves Rosa, Paula Barrionuevo, Marina Palermo, Martín Isturiz.

División Inmunología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires. luismari@datamarkets.com.ar.

Los pacientes sépticos por bacterias Gram negativas suelen tener complicaciones relacionadas con infecciones oportunistas. Esto ha sido atribuido a la inmunosupresión causada por los LPS que, entre otros efectos, elevan los niveles de glucocorticoides (GC). Los objetivos de este trabajo fueron: 1) establecer un modelo experimental de inmunosupresión por LPS; 2) evaluar la efectividad del RU, droga que bloquea los receptores para progesterona y GC, en el restablecimiento de la respuesta inmune. Para ello, se utilizaron 4 grupos (a, b, c y d) de 10 ratones BALB/c machos. Los grupos a, b, y c, fueron inoculados con 5 ug de LPS ip. cada 24 hs, por 5 días. Veinticuatro horas después los grupos b) y c) fueron tratados con 600 ug de RU ip cada 24 hs por 6 días. El grupo c) mantuvo el tratamiento de 5 ug de LPS cada 24 hs. Simultáneamente con la primer dosis de RU se inocularon 1×10^7 glóbulos rojos de carnero a todos los grupos. Siete días después se evaluó el nivel de anticuerpos por hemaglutinación. Los resultados, expresados como promedio de la máxima dilución del suero que da reacción positiva, fueron los siguientes: grupo a) 1:22; b) 1:181; c) 1:426; d) 1:394. El experimento fue repetido 2x con similares resultados (grupo a vs. b, c y d, $p < 0.001$). Conclusiones: el esquema de tratamiento con LPS es adecuado para inducir una inmunosupresión. La reversión de este efecto por el RU plantea la importancia y, eventualmente, la necesidad de profundizar el estudio de esta droga en la inmunosupresión generada en los procesos sépticos.

212. Cambios significativos en el reclutamiento celular en la infección por *C. albicans* asociados al estrés crónico variado (ECV). Cecilia Rodríguez*, Silvia Correa, Pablo Iribarren y Claudia Sotomayor.

*Bioquímica Clínica, Fac. de Cs. Químicas Univ. Nac. de Córdoba. *crodr@bioclin.fcq.unc.edu.ar*

La candidiasis es una micosis oportunista cuyo desarrollo está ligado a desequilibrios en el sistema inmune como ocurre en situaciones de estrés. En nuestro modelo evaluamos las modificaciones en el reclutamiento de células de la inmunidad innata luego de la aplicación de ECV. Ratas Wistar fueron infectadas i.p. con *C. albicans* (C) o infectadas e inmediatamente expuestas al ECV (CE). Tres o 10 días (d) post-tratamiento, el número absoluto de células peritoneales totales, de $N\phi$ y $M\phi$ disminuyó en el grupo CE ($p < 0.05$). Estudios fenotípicos (FACS)

revelaron una disminución de MAC-1 en $M\phi$ -CE (d3 $p < C < 0.002$) mientras que la expresión de CD44 no fue modificada. Citoquinas proinflamatorias y hormonas del estrés pueden modificar la expresión de dichas moléculas. Cuando evaluamos TNF- α (d3), observamos una disminución en los animales CE respecto a los C ($p < 0.03$). Por otro lado, los niveles de ACTH en sangre estuvieron siempre elevados en el grupo CE, mientras que en el grupo C, sólo en el día 3 ($p < 0.01$). La expresión de moléculas marcadoras de activación celular como ICAM-1 y MHC-II IA, no manifestó diferencias significativas entre estos dos grupos. La marcada diseminación fúngica observada en animales infectados por *C. albicans* y expuestos a ECV, estaría asociada a un menor reclutamiento de $M\phi$, y a la pérdida de la función microbicida (resultados previos) demostrando la importancia de esta célula en el control de este patógeno oportunista.

213. Utilidad diagnóstica de un ELISA que combina 2 antígenos proteicos de *Brucella*: CP24 y p18. Juliana Cassataro, Carlos A. Velikovsky, Laura Bruno, Diego Levi, Carlos A. Fossati y Pablo C. Baldi.

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas e Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Fac. de Farmacia y Bioquímica (UBA). e-mail:juscassat@fyb.uba.ar.

Se ha descrito una proteína citosólica de *Brucella* de 24 kDa (CP24) que constituiría un factor de liberación ribosomal y que es reconocida por sueros de ovejas infectadas. Hasta ahora no se había obtenido CP24 pura ni se había ensayado su reconocimiento por sueros humanos. Por ello, decidimos clonar el gen de CP24 en el vector pET17b para sobreexpresarla en bacterias. La proteína purificada a partir de los extractos bacterianos se utilizó para sensibilizar placas de ELISA. En primera instancia se ensayaron 33 sueros de pacientes con brucelosis activa y altos títulos de anticuerpos anti-LPS de *Brucella*, de los cuales 15 fueron positivos para CP24. Algunos de estos últimos no habían mostrado reactividad contra una proteína citosólica de *Brucella* de 18 kDa (p18) de probada utilidad diagnóstica. Decidimos evaluar si la determinación de reactividad contra la mezcla de CP24 y p18 incrementa la detección de pacientes brucelosos respecto del ELISA con p18 sola. Un ensayo con Ac monoclonales específicos demostró que la reactividad contra cada proteína en la mezcla CP24+p18 es similar a la obtenida contra cada proteína en forma separada. Se evaluaron con el ensayo combinado 35 sueros de pacientes negativos para p18, de los cuales 29 fueron positivos para la mezcla CP24+p18. Estos resultados sugieren que el ELISA basado en las proteínas CP24 y p18 puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de la brucelosis humana.

214. Respuesta inmune Th1 y protección inducida por la inmunización con un plásmido codificante para la proteína p18 de *Brucella*. C. A. Velikovsky, J. Cassataro, R. Bowden, G. H. Giambartolomei, L. Bruno, C. A. Fossati y M. Spitz.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (UBA-Conicet). Laboratorio de Inmunogenética. Htal de Clínicas (UBA). Laboratorio de Inmunología y Biotecnología, Facultad de Ciencias Veterinarias, (UNICEN). Fax: 4964-0024.2

Las vacunas a ADN inducen respuesta humoral, respuesta celular de tipo Th1 y, en algunos casos, protección frente a la infección por patógenos intracelulares. Decidimos probar un sistema de vacunación a ADN clonando una proteína de 18kDa (p18) de la bacteria intracelular *Brucella abortus* en el vector de expresión eucariota pcDNA3. Se inmunizaron ratones Balb/c con 100 ug del plásmido codificante para p18 (pcDNAp18) y con pcDNA3 (control) a las 0, 2, 4 y 6 semanas por vía intramuscular e intradérmica. Se estudió la producción de anticuerpos por ELISA indirecto, hallándose altos títulos de todos los isotipos investigados (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e

IgG3). Se observó un predominio de IgG2a con respecto de IgG1. Determinamos, por ELISA y RT-PCR, la presencia de citoquinas en cultivos de esplenocitos estimulados con p18, observándose aumento en la producción de IFN- γ e IL-2 en el grupo pcDNAp18 ($p < 0.05$) sin producción de IL-10 ni de IL-4. Además ratones inmunizados con los plásmidos se desafiaron con *B. abortus* 544. Se observó una disminución del número de bacterias en el bazo de ratones pcDNAp18 con respecto al control ($p < 0.01$). Estos resultados sugieren que la inmunización con pcDNAp18 induce respuesta inmune de tipo Th1 y protección frente al desafío con brucela virulenta.

215. Antígenos secretados por *Brucella* durante el crecimiento logarítmico en medio líquido en condiciones de estrés. Pablo C. Baldi.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (pablobal@ffyb.uba.ar).

Aunque es sabido que en condiciones de estrés muchas bacterias intracelulares secretan proteínas, incluso algunas de utilidad diagnóstica o vacunal, este fenómeno no ha sido estudiado en *Brucella*. Por ello, decidimos cultivar *B. melitensis* H38 en caldo tripticasa-soya (TSB) en condiciones normales y de estrés (TSB pH 5.5 y TSB libre de calcio). Se observó la misma tasa de crecimiento logarítmico en todos los medios ensayados. Se tomaron muestras a las 24 hs. de cultivo, se eliminaron las bacterias y se precipitó el medio con sulfato de amonio. Los precipitados redisolviéndose se analizaron por SDS-PAGE y por Western blot frente a sueros de pacientes brucelosos. En el PAGE se observó en todas las muestras (salvo el TSB control) una banda notoria pero difusa entre los 35 y los 50 kDa. Se notó un duplete a unos 20 kDa en todas las muestras, aunque más fuerte en el cultivo sin calcio. Por Western blot se observó en todos los cultivos, pero no en el TSB control, un bandeo en escalera entre los 37 y los 52 kDa y una banda difusa entre los 80 y los 90 kDa. Toda reactividad por Western blot desapareció al adsorber los sueros con *B. abortus* entera, sugiriendo que los antígenos detectados se hallan en la membrana externa de la bacteria. El bandeo en escalera y la reactividad frente a un Ac monoclonal específico indicaron que el antígeno de 37-52 kDa es LPS. Se está trabajando para caracterizar el antígeno de 80-90 kDa y para detectar productos secretados bajo otras condiciones de estrés (oxidantes, alta temperatura).

216. Caracterización de anticuerpos monoclonales contra antígenos de *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*. María Serradell¹; Ricardo Negroni²; Alberto Fossati¹.

¹Cátedra de Inmunología, Cs. Exactas, UNLP, La Plata. ²Centro de Micología, Fac. de Medicina, UBA, Buenos Aires. e-mail: maserr@biol.unlp.edu.ar

Los microorganismos *Histoplasma capsulatum* (Hc) y *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) son hongos dimórficos que causan micosis sistémicas endémicas en humanos. Ambas especies están estrechamente relacionadas taxonómicamente y distribuidas en zonas tropicales y subtropicales de América. En este trabajo nos proponemos analizar y caracterizar la reactividad de anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra antígenos de Hc y Pb en fase levaduriforme. Los AcMo se obtuvieron siguiendo la técnica convencional de Galfré y Milstein. Como inmunógenos se utilizaron extractos citoplasmáticos totales y una fracción del extracto de Pb recuperada por electroelución. La reactividad de los AcMo se analizó por ELISA, dot-blot e inmunoblotting (IB). Se obtuvieron cuatro AcMo a-Pb (2C3, 2A8, 3F11 y 5F10) y cinco a-Hc (3A12, 4D2, 5B1, 5B8 y 5E1). Los AcMo 2A8, 3F11, 5F10 y 5B8 reconocen componentes de reactividad cruzada entre Hc y Pb, mientras que los restantes reconocen solamente antígenos específicos del correspondiente microorganismo. La mayoría de los AcMo parece reconocer

epitopes de naturaleza proteica, dado que la oxidación con periodato no afecta los perfiles de reactividad en IB. Actualmente estamos analizando otros hibridomas.

217. Expresión de una cadena VB2.1 de un TCR humano en *E. Coli* y análisis de su interacción con TSST-1 de *S. aureus*. Marisa M Fernández, Mirta E Grimaldi, Emilio L Malchiodi y Andrea S Llera.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET-UBA) FfyB, UBA. emalchio@ffyb.uba.ar

Los superantígenos (SAGs) son toxinas microbianas capaces de estimular a 5-20% de linfocitos T (LT) y producir shock tóxico por liberación excesiva de moléculas proinflamatorias. Diferentes SAGs activan distintas familias de LT, según la región variable de la cadena beta de su receptor T (TCR). Nuestro objetivo es estudiar las bases moleculares de la interacción entre un TCR humano VA24.1CA/VB2.1CB, y la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1). Se expresó la cadena beta como cuerpos de inclusión en *E. coli*. La misma se solubilizó en urea 8M, se replegó in vitro por dilución y se purificó por cromatografía de exclusión molecular y de intercambio aniónico, con un rendimiento final de 2mg/L de cultivo. En SDS-PAGE reveló una única banda de 28 kDa. Su unión a TSST-1, determinada por resonancia plasmática de superficie (BIAcore), arrojó una Kd de 0.7 μ M. Del mismo modo, se inició la producción de la cadena alfa del TCR mencionado. Los cuerpos de inclusión mostraron una banda mayoritaria de 23 kDa en SDS-PAGE y se ha iniciado su replegamiento. En suma, se logró la expresión de una cadena beta funcional que confirmó la especificidad de TSST-1 por la familia VB2.1. Se intentará obtener el heterodímero con el fin de estudiar la estructura tridimensional y el modo de interacción del TCR con TSST-1.

218. Vacuna DTPw y DTPacel: análisis de la respuesta inmune celular frente a *B.pertussis* y toxoide tetánico. María Victoria Lavigne, Carlos Atzori, Marisa Castro, Silvana Deluchi, Luciana Piudo, Nancy Mateo, María de Luján Calcagno, María Luisa Brero, Marcela Manghi.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, (CONICET-UBA). Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos-ANLIS "Dr. CG Malbrán". e-mail: manghim@ffyb.uba.ar

En estudios de campo las vacunas pertussis acelulares resultaron menos eficaces que la DTPw. Además, la inmunización con DTPacel conduce a una lenta depuración de Bp. Analizamos, para ambas vacunas, el tipo de respuesta Th específica para Bp (patógeno intracelular) y TT. En cultivos de células de bazo de ratones Balb/c inoculados se analiza la proliferación y niveles de IFN γ , IL-5, IL-6 e IL-12 estimulando con TT, TT/Bp, Bp, LPS (submitogénico) y TT/ LPS. Para DTPw, Bp indujo proliferación específica, altos niveles de IFN γ y bajos de IL-5. TT, TT/Bp y TT/LPS produjeron altos niveles de ambas interleuquinas. El patrón de producción de IL-12 fue similar en el grupo control y DTPacel. Para DTPw, los niveles fueron significativamente mayores para Bp y LPS y aparentemente "down" regulados por los estímulos inductores de citoquinas Th2 (TT, TT/Bp y TT/LPS). Los mayores niveles de IL-12, IFN γ e IL-6 observados para DTPw evidencian la mayor sensibilidad para el LPS ya reportada para inmunizaciones con bacterias. Las células sensibilizadas con DTPacel no reconocieron a Bp cuando fueron estimuladas in vitro , si bien lo hicieron con los demás estímulos específicos produciendo sólo IL-5 (respuesta Th2). Conclusión: La DTPacel , a diferencia de DTPw, es incapaz de dar una respuesta específica anti-Bp del tipo Th1. Esta observación estaría en línea con la incompleta depuración de este patógeno observada en el modelo de infección respiratoria en ratones.

219. Respuesta inmune antitetánica: 1) Rol de las citoquinas en la actividad moduladora. Nancy Mateo,

María Victoria Lavigne, Marisa Castro, Silvana Deluchi, Luciana Piudo, Carlos Atzori, María de Luján Calcagno, María Luisa Brero, Marcela Manghi.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, (CONICET-UBA). Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos-ANLIS "Dr. CG Malbrán". Email: manghim@ffyb.uba.ar

Se analiza la inmunogenicidad del toxoide tetánico(TT) cuando es componente de vacuna soluble (DT) y particulada (DTPw). En cultivos de células de bazo de ratones Balb/c vírgenes e inoculados con DT, DTPw se analiza la proliferación estimulando con TT, TT/Bp, Bp, LPS (submitogénico), TT/LPS y se miden los niveles de IFNg, IL-5 e IL-6. Bp sólo estimuló la proliferación específica para DTPw, en cambio TT, TT/Bp y TT/LPS lo hicieron para ambas vacunas. Para DTPw niveles similares de IFNg se midieron con todos los estímulos, quizás por activación de LTh1 específicos y la acción de LPS sobre macrófagos. El nivel de IFNg frente al estímulo con LPS evidencia la mayor sensibilidad a la endotoxina descrita para inmunizaciones con bacterias. IL-5 fue inducida por TT, TT/Bp, TT/LPS pero no por el estímulo con Bp en nuestras condiciones de trabajo. Para DT, todos los estímulos específicos produjeron IL-5 pero no IFNg (respuesta Th2). IL-6 fue detectada en todos los estímulos (para DTPw) o de LPS y TT/LPS (para DT). Conclusión: la presencia de Bp en el inóculo monta una respuesta inflamatoria (IFNg, IL-6) modificando la respuesta antitetánica de tipo Th2 a Th1/Th2 con iguales niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos.

SISTEMA CARDIOVASCULAR III

220. Agregabilidad eritrocitaria en la evolución de la artritis reumatoidea crónica.(ARC). Alejandra Luquita¹, Leda Urli¹, María Svetaz², Ricardo Volpintesta², Simón Palatnik¹, Marta Rasia¹.

¹ *Facultad Cs. Médicas,* ² *Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas- UNR. e-mail: luquitale@hotmail.com*

El aumento de la agregabilidad eritrocitaria (AE) es patognomónico de los procesos inflamatorios crónicos -incluyendo a la artritis reumatoidea crónica (ARC)- por la presencia de proteínas de fase aguda en el plasma. En nuestro laboratorio estamos estudiando las variables hemorreológicas en relación a la evolución de la enfermedad en un grupo de pacientes (n: 8) que reúnen 4 de los 5 criterios internacionales de ARC, durante el tratamiento con corticoides no esteroideos y antiinflamatorios. La enfermedad se inactivó en el 50% de ellos al tercer año y en el total al cuarto año. A lo largo de los 4 años se les determinaron, entre otros parámetros, la agregabilidad eritrocitaria, la deformabilidad eritrocitaria y la concentración de proteínas IgG, IgM y fibrinógeno. Los resultados obtenidos confirmaron la correlación esperada entre AE y deformabilidad eritrocitaria ($p < 0.01$) y entre AE y concentración de proteínas ($p < 0.01$). Además se pudo comprobar que estos parámetros se normalizaron progresivamente en el curso del tiempo alcanzando valores fisiológicos al inactivarse la enfermedad ($p < 0.01$). Estos resultados confirman que la AE resulta un indicador fidedigno de la situación del paciente con ARC y demuestran su utilidad como indicador de la evolución de la enfermedad.

221. Dinámica del Intervalo QT del Electrocardiograma (ECG) en ratas de Línea "I". María Bernasconi¹; Héctor Berra¹; Maximiliano Tamae² Silvia Revelli²

¹ *Cátedra de Fisiología Facultad de Ciencias Médicas U.N.R.* ² *Instituto de Inmunología. Facultad de Ciencias Médicas. UNR. grigiber@satlink.com Presentado por Adriana Torres*

La duración del intervalo QT del electrocardiograma (ECG) es dependiente, entre otros factores, del tono autonómico y de la frecuencia cardíaca (FC). La rata puede ser utilizada como

modelo de miocardiopatías y para el estudio de la cinética de drogas con efecto cardíaco. Sin embargo, el comportamiento del intervalo QT del ECG frente a cambios en la FC ha sido poco estudiado en ratas de línea "I". **Objetivo:** Caracterizar la dinámica del intervalo QT del ECG en respuesta a variaciones de la FC en ratas normales de línea "I". **Material y métodos:** Se utilizaron ratas machos (n=6), adultas jóvenes (edad 40 ± 4 días), anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg), a las que se indujo hemorragia (pérdida de 5ml en un período de 30 minutos) por canalización de la arteria femoral. Se registraron ECGs continuos. Se midieron los intervalos QT y RR (promedio de 20 ciclos cada minuto). Se obtuvo la relación QT/RR durante el período de descenso de la FC y durante el período de ascenso de la FC. **Resultados:** La relación QT/RR durante el período de descenso de la FC fue lineal y con pendiente positiva. La relación QT/RR durante el período de ascenso de la FC fue lineal y con pendiente negativa. **Conclusiones:** La presencia de una pendiente negativa expresa la prolongación del intervalo QT en respuesta al ascenso de la FC. Este hallazgo poco frecuente es de interés para el estudio de los factores que afectan el QT.

222. Síndrome de Raynaud y viscosidad sanguínea. Verónica Gomez^{*}, Bibiana Leroux^{**}, María Svetaz^{***}, Marina Rinaldi^{**}, Isabel Spengler^{*}. *Cátedra de Física Biológica,

^{**}*Cátedra Dermatología, Facultad de Medicina.* ^{***} *Dpto Bioquímica Clínica. Facultad de Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de Rosario. leroux-mb@hotmail.com*

El Síndrome de Raynaud está relacionado con perturbaciones vasomotoras provocadas por el frío, por eso fue interesante investigar la existencia de variaciones en la viscosidad sanguínea (η_s) de 26 pacientes con Síndrome de Raynaud a dos temperaturas de trabajo (37°C y 22°C) y compararlas con valores hallados en 20 controles. Se determinaron en los dos grupos hematocrito (Hto); η_s y viscosidad plasmática (η_p) con un viscosímetro como plato a las dos temperaturas antedichas y a varias velocidades de cizallamiento (v_c) (230s^{-1} , 115s^{-1} , 46s^{-1} y 23s^{-1}) y con estos valores se calculó la viscosidad corregida a un hematocrito del 45% (η_p) con la siguiente fórmula: $(\eta_p / \eta_p^{45\text{Hto}})$. Tanto en los pacientes como en los controles se encontró que la η_s la η_p y la v_c fueron mayores a 22°C que a 37°C ($p < 0,0000001$ en todos los casos y para las distintas v_c). Cuando se compararon las diferencias: (η_s a 22°C - η_s a 37°C) y (η_p a 22°C - η_p a 37°C) en pacientes con las correspondientes diferencias en los controles no se encontraron resultados estadísticamente significativos. Dado que el incremento de la viscosidad a baja temperatura es el mismo en los pacientes que en los controles, podemos concluir que no existen evidencias para sustanciar la hipótesis de que el fenómeno de Raynaud es causado por un aumento de la viscosidad a baja temperatura.

223. Participación de la proteína quinasa C y de la tirosina quinasa en el efecto inotrópico positivo de la angiotensina II. Margarita Salas, Martín Vila-Petroff, Julieta Palomeque, Alicia Mattiazzi.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. e-mail: masalas@netverk.com.ar

La cascada de señales involucrada en el efecto inotrópico positivo (EIP) de la Ang II no es bien conocida. Con el fin de dilucidarla, se realizaron experimentos en músculos papilares (MP) y miocitos aislados (M) de gato contrayéndose a frecuencia y temperatura constantes. La Ang II ($0.5 \mu\text{M}$) produjo en MP un EIP que llegó al máximo (MEIP) entre los 5 y 10 min de administrada ($196 \pm 12\%$ del control, $n=17$), decayendo luego hasta estabilizarse a los 40 min en $153 \pm 9.6\%$ (EIPE). En M, la Ang II produjo un MEIP de $163 \pm 22\%$ que cayó a $129 \pm 14\%$ (EIPE) y un aumento del calcio intracelular (Ca_i) estimado a través del indicador fluorescente Indo-1, de $43 \pm 8\%$ (MEIP) y de $30 \pm 3\%$ (EIPE) $n=5$. La supresión funcional

del retículo sarcoplasmático con 0.5µM de rianodina o la administración del inhibidor específico de los receptores de IP₃ (2-APB, 5 µM) no modificó el EIP ni el aumento del Ca_i producido por Ang II. Esto indica que el IP₃ no interviene en el EIP de la Ang II. El inhibidor de la proteína quinasa C (PKC), celeritrina (20µM) disminuyó el MEIP a 125 ± 7.7%, (MP, n=8) y a 97 ± 3 %, (M, n=4), suprimiendo el EIPE. Resultados similares se obtuvieron con otro inhibidor de PKC, calfofostina C (1µM). Genisteína, inhibidor de la tirosina quinasa (TK) produjo en MP una disminución del MEIP (154.4 ± 7.43%, n=5) y suprimió el EIPE. Se sugiere que la PKC y la TK participarían en la cadena de señales que determinan el EIP de la Ang II.

224. Alteraciones en la contractilidad vascular en la rata con sobrecarga crónica de fructosa. Pablo Damiano, Inés Rosón, Susana Cavallero, Marcos Mayer, Ignacio de la Riva, Ana Puyó.

Cátedras de: Fisiología, Laboratorio de Fisiopatología de la Hipertensión Arterial, Facultad de Medicina; y Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. e-mail: apuyo@ffyb.uba.ar

La administración crónica de fructosa provoca en la rata hipertensión arterial y alteraciones metabólicas como hiper glucemia e hipertrigliceridemia con insulina normal. Nuestro objetivo fue continuar con el análisis del comportamiento de la reactividad vascular con relación a dichas alteraciones. Se estudiaron ratas Sprague-Dawley machos (180g) divididos en 2 grupos: Fructosa (F; n=12), las que tomaron una solución de F al 10% como bebida durante 22 semanas, y control (C; n=12), con agua como bebida. Se registró la presión arterial (PA) indirecta. Se estudió la respuesta contráctil al 12,13-forbol dibutirato (PDBu, activador de la proteína quinasa C) y relajación a la insulina en anillos de aorta torácica. El grupo F presentó peso corporal (g: 588±22 vs 514±16, p<0.02) y PA aumentados (mmHg: 127.9 ± 2.9 vs 117.5 ± 1.8, p<0.01). La relajación provocada por insulina (240 mU/ml) en anillos precontractados por fenilefrina (3.5.10⁻⁷ M) no fue diferente entre las ratas C y F. La respuesta al PDBu fue similar en los grupos C y F, no modificándose con nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). La preincubación con insulina (1 mU/ml) produjo una caída de la tensión máxima solo en el grupo control (% respuesta al KCl: 216±4 vs 195±8, p<0.05). Esta menor respuesta desapareció al preincubar los anillos con L-NAME. Conclusión: existiría una resistencia a la acción relajante de la insulina sobre la contracción al PDBu en las ratas con sobrecarga de fructosa. Dicha respuesta estaría mediada por óxido nítrico.

225. Participación de la dopamina (DA) y del óxido nítrico (ON) sobre la función renal en la expansión extracelular (E). Angeles Costa, Analía Loria, Marcela Marchetti, Ana Balaszczuk, Cristina Arranz.

Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química y Metabolismo de Fármacos. CONICET (mcosta@huemul.ffyb.uba.ar)

En estudios previos mostramos que tanto el L-NAME como el haloperidol (H) disminuyen la diuresis, natriuresis y kaliuresis inducidas por la L-Arginina (L-Arg) precursor del ON. Estos efectos se hacen más notorios en la E. Se estudió la participación de la DA en el efecto hipotensor y renal de la L-Arg en la E (10% pc). Las ratas divididas en Control (C) y E, recibieron: L-Arg (250 mg/kg, iv), L-NAME (1mg/kg, iv), H (3mg/kg ip) y L-Arg + H (n=6). Se evaluó: presión arterial media (PAM, mmHg), volumen de filtrado glomerular (VFG, ml/min), flujo plasmático renal (FPR, ml/min) y excreción de nitritos y nitratos (NOx, nmol/min/100g). El efecto sobre la PAM de los tratamientos no se modificó por la E y el H no provocó cambios en el efecto hipotensor de la L-Arg en C y E (C: Basal (B)= 88±12, L-Arg= 62±5*, L-NAME= 128±4* H=82±8, L-Arg+H=64±5*; E: B=102±4, L-Arg=73±6*, L-NAME=128± 5*, H= 85±9, L-Arg+H=75± 6*). La L-Arg aumentó el FPR en C sin modificar el

VFG (FPR: B=11.96±0.81 vs L-Arg=14.52±1.05, p<0.01). La E aumentó el VFG sin modificar el FPR (VFG: C=3.08±0.28 vs E=5.42 ±0.46, p<0.01). La L-Arg, el H y L-Arg+H no tuvieron efecto sobre esos parámetros. La E aumentó la excreción de NOx, efecto que fue revertido por el H.(C: B=0.18±0.03, L-Arg=0.98±0.16*, L-NAME=0.04±0.01*, H= 0.15±0.04, L-Arg+H=0.52±0.11*#; E: B=0.52±0.08, L-Arg=1.96±0.22*, L-NAME= 0.06±0.02*, H=0.26±0.06*, L-Arg+H=1.04± 0.15*# (*p<0.01 vs B, # p<0.01 vs L-Arg). La DA no participaría en el mecanismo de acción del ON sobre el tono vascular pero ambos tendrían un papel importante en la adaptación de la función renal durante la E.

226. Dosis Bajas de Diltiazem no Protegen al Miocardio de la Disfunción Mecánica Postisquémica en Ovejas Conscientes. Héctor del Valle, Jorge Negroni, Elena Lascano, Alberto Crotogini.

Departamento de Ciencias Farmacológicas, Fisiológicas y Bioquímicas. Universidad Favaloro. Buenos Aires. (delvalle@favaloro.edu.ar).

Introducción: existe una relación entre protección por bloqueantes (B) del canal de Ca²⁺ (CCa²⁺) y cardiodepresión preisquémica (PI). Sin embargo, se desconoce si los BCCA²⁺ protegen sin depresión previa de la función cardíaca. **Objetivo:** determinar el efecto protector de una dosis baja de Diltiazem (D) (10ug/kg/min) suficiente para bloquear los CCa²⁺ sin alterar la hemodinamia (H) PI (presión de fin de sístole (PFS) y frecuencia cardíaca (FC)). **Métodos:** se usaron 2 grupos de ovejas instrumentadas con sensor de presión ventricular, oclisor coronario y microcristales de espesor parietal: a) control (C): 12 min de isquemia (I) con 2 hs de perfusión (R) [n=9] y b) D: igual a C con D durante 10 min antes de I [n=5]. **Resultados:** la PFS y FC (mmHg y latidos/min) y la función sistólica (fracción de espesamiento (FE)) y diastólica (compliance radial (CR)) en porcentajes respecto del basal (100%) en PI (1 min antes de I), I y como promedio de la R muestran:

	FC (M±ES)		PFS (M±ES)		FE (M±ES)		CR (M±ES)	
	C	D	C	D	C	D	C	D
Basal	85±3	90±5	100±4	102±6	100	100	100	100
PI	83±4	81±7	101±5	95±4	96±2	97±4	99±1	97±2
I	94±6	108±6	100±4	106±8	-27±14	-24±8	63±16	58±12
R	87±4	102±2	98±4	100±4	54±2	59±6	101±5	97±10

Conclusión: los BCCA²⁺ en dosis que no alteran la H PI no favorecen la recuperación mecánica (FE,CR) durante la R.

227. Alteraciones bioquímicas asociadas con la hiporreactividad vascular en un modelo de endotoxemia inducido por la administración de lipopolisacáridos (LPS). Luz Orliac¹, Victoria Mendizábal¹, Alejandro Lomnicz², Claudia Mohn², Ana Franchi², Valeria Rettor², Edda Adler¹.

¹Instituto de Investigaciones Farmacológicas. ²Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. FAX: 4-963-8593

El objetivo de este trabajo fue evaluar los posibles cambios bioquímicos que preceden a la hipotensión asociada al shock endotóxico. Ratas macho Sprague-Dawley se inyectaron con 5mg/kg i.p. de LPS, dosis que no produce hipotensión. En lechos mesentéricos aislados a las 6 h de la inyección se midieron la reactividad vascular como respuestas contráctiles a la noradrenalina, la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) por conversión de [¹⁴C]L-arginina y la producción de 6-ceto PGE₂, PGF1alfa y PGF2alfa por radioconversión de [¹⁴C]ácido araquidónico. El tratamiento con LPS produjo una disminución del 50 % (p<0.05; n=6) en las respuestas contráctiles a la noradrenalina, que fue revertido por el inhibidor de la iNOS aminoguanidina (AG: 20 mg/kg i.p.) (n=7) pero no por el inhibidor de la ciclooxigenasa II (COX-II) meloxicam (MLX:

0.25 mg/kg i.m.) (n=6). La administración de LPS produjo un incremento de 11.5 veces en la actividad de la iNOS ($p < 0.001$; n=7) revertido por el pretratamiento con AG ($p < 0.01$, n=4) pero no con MLX (n=4). Asimismo, se observó un aumento en la producción de todas las prostaglandinas dosadas ($p < 0.001$; n=7) prevenido tanto por MLX ($p < 0.01$; n=4) como por AG ($p < 0.001$; n=7). Se concluye que la hiporreactividad vascular que precede a la hipotensión en la endotoxemia estaría asociada a un aumento en la actividad de la iNOS y en la producción de prostanoideos. Mientras que el óxido nítrico participaría en las respuestas vasculares, los prostanoideos por sí solos no serían responsables de la hiporreactividad observada.

228. Ausencia de respuesta miogénica en el lecho vascular mesentérico de ratas diabéticas por administración de estreptozotocina. Gustavo Rinaldi.

Cátedra de Fisiología Humana, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la diabetes por estreptozotocina (STZ) sobre la respuesta miogénica (RM) del lecho vascular mesentérico, se utilizaron 7 ratas inyectadas con 60 mg/kg de STZ IV (DI) y 9 ratas inyectadas solamente con vehículo (CO). A las 3 semanas se extrajo el mesenterio y se perfundió por la arteria mesentérica a flujo constante y a 37°C, midiendo la presión de perfusión y el flujo en forma simultánea. La RM se evaluó mediante el aumento espontáneo de la resistencia por sobre el valor alcanzado al incrementar el flujo de 1.4 a 5.9 ml/min. En soluciones con Ca 0 mM y K 5 mM o con Ca 1.6 mM y K 5 mM no se observó RM ni en CO ni en DI. En solución con Ca 1.6 mM y K 80 mM y partiendo de similares niveles de resistencia ($CO = 15 \pm 3$ y $DI = 16 \pm 4$ mmHg.ml.min⁻¹) el aumento rápido de flujo provocó en ratas CO un aumento lento y sostenido de resistencia de 3.1 ± 0.8 mmHg.ml.min⁻¹ a los 10 minutos, mientras que en DI la resistencia disminuyó en 1.7 ± 0.4 mmHg.ml.min⁻¹ ($P < 0.05$) en igual tiempo. La perfusión a 34°C eliminó la RM en CO. Se concluye que 1) El aumento de resistencia puede considerarse una RM por estar provocada exclusivamente por estiramiento y ser temperatura-dependiente, y 2) La RM apareció en CO por mecanismos independientes de la entrada de Ca a través de la membrana celular y supuestamente alterados en ratas DI.

229. Estimación de la energía de adhesión eritrocitaria del sistema Receptor de Hialuronato (CD44)-Hialuronato. ¹Mabel D'Arrigo, ¹Patricia Foresto, ¹Virginia Suarez Sala, ¹Juana. Valverde y ²Rodolfo. Rasia.

¹Lab. Inmunohematología Hemorrelogía - Depto Bioq. Clínica. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farm. Universidad Nacional de Rosario. ²FIR - CONICET

La adhesión anormal de eritrocitos (GR) a las células endoteliales se ha observado en algunas vasculopatías (diabetes, hipertensión). Al igual que todo proceso de interacción celular, la adhesión de GR a Hialuronato (H) se produce con intercambio energético. De allí la importancia de determinar la energía intercambiada en la reacción de adhesión cuyo valor suministra una estimación de la potencia de la misma. Nuestro objetivo fue medir la energía específica de adhesión (δ_a) del receptor de H (CD44) eritrocitario a su ligando (H). Para ello se utilizó una cámara de flujo controlado, de diseño propio, adaptada a un procesador digital de imágenes. La (δ_a) se calculó aplicando la ecuación de conservación de la energía ($\delta_a = 3 \cdot \eta \cdot Q \cdot A_0 \cdot D_0 / h^2 \cdot a \cdot A$) donde η es la viscosidad, Q es el caudal (0-800 mm³/min), A_0 es el área inicial expuesta del GR, D_0 es el desplazamiento del GR desde su posición inicial, A_i es el área del GR despegada (valores medidos), a es el ancho y h la altura del canal de flujo (valores establecidos). Los resultados se muestran en la tabla:

Q mm ³ /min	0	30	60	100	150	200	400	800
δ_a	0	0.08±	0.12±	0.27±	0.43±	0.58±	1.37±	2.54±
microerg/cm ²		0.03	0.15	0.09	0.15	0.35	0.46	0.52

La estimación de la δ_a puede ofrecer una significativa ayuda en la comprensión de numerosos fenómenos de interacción celular fisiológicos y patológicos.

REPRODUCCION II

230. Análisis de segregación y aneuploidía por FISH en espermatozoides de un portador de translocación Robertsoniana (t(13;14)). Roberto Coco, Claudia Sartori, Fabián Coco.

Fecunditas, Instituto de Medicina Reproductiva. (Fecunditas@Fecunditas.com.ar)

Introducción: La evaluación del riesgo reproductivo en portadores de translocaciones hasta hace poco tiempo se hacía teniendo en cuenta el riesgo teórico y el empírico si existiera. Hoy con FISH en gametos se puede estimar el real riesgo. **Objetivos:** Evaluar la segregación del trivalente meiótico y el posible efecto intercromosómico. **Pacientes y Métodos:** Varón infértil con cariotipo 45,XY,t(13;14). Para el FISH se usaron 3 mezclas de sondas: a) una locus específica del 13 y una telomérica del 14, b) tres centroméricas 18, X e Y y c) dos loci específicas 13 y 21. Se analizaron 1000 espermatozoides para cada mezcla y se registraron los patrones de segregación del trivalente y las aneuploidias de los cromosomas 13, 18, 21 y sexuales. **Resultados:** Las frecuencias de segregación alternada, adyacente y 3:0 fueron: 67.66%, 31.14% y 1.20%, respectivamente. Las frecuencias de aneuploidias de los cromosomas 13, 18, 21 y par sexual fueron: 30.18%, 0.99%, 22.73% y 3.47%, respectivamente. **Conclusiones:** Se infiere que el paciente no solo tiene riesgo de producir concepciones con aneuploidias de los cromosomas 13 y 14, sino también la de los cromosomas 21 y sexuales por el fuerte efecto intercromosómico demostrado.

231. Participación del sistema Fas-Fas L en el daño de las células germinales en un modelo de orquitis autoinmune experimental. Susana Theas, Claudia Rival, Livia Lustig.

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. e-mail: ciruba@fmed.uba.ar

Se ha señalado al sistema Fas-Fas L como un regulador del fenómeno fisiológico de apoptosis durante la espermatogénesis. El objetivo de este trabajo es determinar si Fas-Fas L está involucrado en el daño de las células germinales en la orquitis autoinmune experimental (OAE). Se indujo una OAE en ratas por inmunización activa con antígenos espermáticos y adyuvantes (E); las ratas se sacrificaron a distintos tiempos. Se correlacionó la histopatología testicular con el número de células germinales inmaduras en los túbulos epididimarios y con la localización, por inmunohistoquímica, de Fas y Fas L en las células testiculares. A partir de los 50 días (d) las células germinales presentes en la luz de los túbulos epididimarios en la OAE progresa significativamente con el tiempo (**35d:** C:11.6±2.5 vs E:19.3±4.6; **50-60d:** C:11.3±1.2 vs E:61.0±22.3*; **70-110d:** C:10.2±0.8 vs E:387.1±133.0**5, **>110d:** C:14.5±3.7 vs E:915.9±152.6**55; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs C, 5 $p < 0.05$, 55 $p < 0.01$ vs E 50-60d). La expresión de Fas fue detectada en espermatoцитos y espermátides y precede al fenómeno de descamación celular. Se detectó una mayor expresión de Fas y Fas L en las células del intersticio testicular en las ratas con OAE vs C. Los resultados sugieren que en la lesión testicular observada en la OAE el sistema Fas-Fas L estaría involucrado en la apoptosis de las células germinales.

232. Anomalías en el estado oxidativo del tejido placentario de ratas diabéticas en los días previos al parto. Evangelina Capobianco, Alicia Jawerbaum, Débora Sinner, Carolina Pustovrh, Verónica White, Martha Gimeno, Elida González.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, (CEFyBO), Conicet. elidate@arnet.com.ar

En placentas de ratas diabéticas no insulino dependientes (D) existe una mayor producción de prostaglandinas (PGs) y del índice de estrés oxidativo que en los animales sanos (C). Es **objeto** de este trabajo vincular dichas anomalías, para lo cual se utilizó la siguiente **metodología**: a) Se evaluó el estado oxidativo placentario mediante la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (en U/mg prot) y los niveles de lipoperóxidos (TBARs) (mmol/mg prot), así como también el porcentaje de conversión del ¹⁴C-ácido araquidónico a diferentes prostanoïdes. La actividad de SOD se encuentra disminuida en D (19.12±1.2 p<0.05) con respecto a C (33.6±1.0) y no varía en los días previos al parto. Los TBARs son mayores en D (0.24±0.03 p<0.05) que en C (0.08±0.01), y sufren un incremento adicional en momentos previos al parto (0.35±0.05, p<0.05). La generación de RLO disminuye la producción de prostaciclina (PGI₂) y aumenta los niveles placentarios de TXB₂ en un 30%. La remoción de RLO no provoca efectos en la producción de prostanoïdes en C, pero disminuye los niveles de TXB₂ en D (10.32±0.87) con respecto a los valores basales (15.00±1.02, p<0.05). En **conclusión**, la placenta de rata D presenta un perfil oxidativo anómalo y un incremento adicional de su índice de peroxidación lipídica en preñez a término. La remoción de RLO disminuye la relación TXB₂/PGI₂ alterada en animales diabéticos, sugiriendo que una mejoría del estado oxidativo sería importante para favorecer la funcionalidad del órgano durante el parto.

233. Acción reguladora de la B-endorfina sobre el óxido nítrico durante la ovulación de la rata. Alicia Faletti, Claudia Mohn, Martha F. de Gimeno y Valeria Rettori.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET, Serrano 669, Capital.

En el proceso de ovulación de la rata intervienen muchos factores proinflamatorios como las prostaglandinas (PGs) y el óxido nítrico (NO) entre otros. La B-endorfina (BE), péptido opioide endógeno, en ensayos in vitro, es capaz de inhibir la síntesis de PGs y la tasa ovulatoria de la rata. El objetivo de este trabajo fue estudiar su acción in vivo sobre algunos de estos factores en ratas prepúberes tratadas con PMSG/hCG para inducir su primera ovulación. Las PGs y la BE se determinaron por RIA. La producción ovárica de BE disminuye por acción de hCG al mismo tiempo que se produce aumento de PGs endógenas y de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOs) ovárica determinada por la conversión de ¹⁴C-arginina en ¹⁴C-citrulina (BE: de 23±2 a 13±1 pg/mg; PGE: de 31±3 a 166±17 pg/mg; NO: de 0.45±0.05 a 1.15 pmol/min.mg; p<0.01). Para contrarrestar la disminución de BE ovárica, se administró localmente este péptido (intrabursa) y 2 hs después se determinó nuevamente la actividad de la NOs. Se observó que este tratamiento aumentó la actividad enzimática (Ctrl=1.13±0.14 vs BE=1.82±0.13 pmol NO/min.mg; p<0.01), efecto revertido por la administración conjunta con naltrexona (N), antagonista opioide (N=1.05±0.11 pmol/min.mg; p<0.02). Esto sugiere que la BE ovárica puede estar regulando la producción de NO necesaria para permitir el aumento de PGs preovulatorias.

234. Efecto de la administración de inhibina intraovárica sobre la apoptosis de células de granulosa de folículos antrales tempranos obtenidos de ratas tratadas con dietilestilbestrol (DES). Alejandra Vitale, Olga Gonzalez, Liliana Dain, Stella Campo, Marta Tesone.

Instituto de Biología y Medicina Experimental- CONICET,

Facultad de Ciencias Exactas- Universidad de Buenos Aires y Centro de Investigaciones

Uno de los posibles factores autocrinos o paracrinos involucrados en el proceso de selección folicular es la inhibina (Inh). La Inh es una hormona proteica gonadal que selectivamente inhibe la producción de FSH hipofisaria, está constituida por dos subunidades (alfa y beta) formando la Inh A (alfa-betaA) y la B (alfa-betaB). Se ensayó el efecto de la administración *in vivo* de Inh (0,5 ug/ovario) en ovario de ratas prepúberes tratadas con DES, que promueve el desarrollo de folículos antrales tempranos. Se utilizó el contralateral como control. Se determinó por la técnica de TUNEL el número de células apoptóticas por campo en folículos preantrales (FP) y antrales tempranos (FA). Hubo un aumento significativo en ovarios tratados con Inh en FA (control, C: 0,17±0,01; Inh: 0,50±0,02), no observándose cambios en FP. Se aislaron FA y se los incubó con FSH y/o distintas concentraciones de Inh durante 24 hs. Se determinó apoptosis por electroforesis de ADN en geles de agarosa, observándose un incremento en los folículos incubados con Inh (4 ng/ml: 117%, 40 ng/ml: 62%). Se ensayó el efecto in vitro de Inh A recombinante sobre la proliferación, medida por incorporación de timidina³H, a células de granulosa inmaduras en cultivo aisladas de ratas tratadas con DES. Se estimuló durante 48 hs con FSH (20 ng/ml), E₂ (500 ng/ml) y TGFbeta (5 ng/ml). Se observó inhibición (p<0,05) de la proliferación (Control: 5543±146 cpm; Inh 4 ng/ml: 4767±174 ;Inh 40 ng/ml: 3480±117). Se postula que la Inh producida por células de granulosa del folículo dominante actuaría como factor paracrino inhibiendo el crecimiento de folículos vecinos, modulando así el mecanismo de selección folicular.

235. Regulación de la formación de estradiol por el Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF-alfa) en células de la granulosa de rata. Ursula Bussmann, Guillermo Lanuza, Lino Barañao.

Instituto de Biología y Medicina Experimental; Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. (e-mail: lbaranao@dna.uba.ar).

La función de las células de la granulosa es modulada por factores intraováricos, actuando como reguladores autocrinos o paracrinos. TNF-alfa, presente en las células foliculares, afecta el desarrollo ovárico. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de TNF-alfa en la modulación de la esteroidogénesis de células de la granulosa inmaduras de rata. Se estudió este proceso en cultivos de dichas células tratadas con los distintos estímulos y luego se midió los niveles de estradiol producidos. TNF-alfa (10 ng/ml) inhibe el efecto de FSH (20ng/ml) en la producción de estradiol: 2.23±0.40 ng/ml comparado con 13.38±0.81 ng/ml al ser sólo tratado con FSH. Esta citoquina no atenuó la síntesis de estradiol promovida por el tratamiento con Bt₂AMPc: 15.40±1.17 ng/ml (grupo Bt₂AMPc) comparado con 13.78±0.80 ng/ml (grupo Bt₂AMPc+TNF-alfa). Al seguir el metabolismo de esteroides mediante TLC, se observó que TNF-alfa aumenta la acumulación de productos 5-alfa-reducidos y que al inhibir la producción de estradiol anula la formación de catecoestrógenos, otros reguladores de la función ovárica. Se demuestra mediante Northern blots que la disminución observada se debe a una inhibición en la transcripción del gen de la aromatasas. Estos resultados indican que TNF-alfa inhibe la formación de estradiol promovida por FSH al regular un paso previo a la formación de cAMP, y que jugaría un rol importante en la alteración de la función ovárica durante procesos fisiopatológicos.

236. Contenido intracelular de un mitógeno para células de la granulosa durante la maduración del ovocito. Fischman, María Laura; Santos, Claudio; Barañao, J. Lino.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias

Exactas y Naturales, UBA. e Instituto de Biología y Medicina Experimental. e-mail: lbaranao@dna.uba.ar

En estudios previos demostramos que ovocitos bovinos estimulan la proliferación en células de la granulosa de rata y que este efecto disminuye con la maduración meiótica. En este trabajo estudiamos si el factor responsable de dicho efecto está presente en el ovocito inmaduro (FI) o si es sintetizado durante el tiempo de cocultivo. Los ovocitos bovinos fueron obtenidos de folículos antrales y madurados *in vitro* (IVM). Parte de los ovocitos FI y los IVM fueron sonicados. Los cultivos primarios de células de la granulosa de rata se cultivaron en medio definido con agregado de oFSH (20 ng/ml) en presencia de FI, IVM (15 ovocitos/pocillo), fracción soluble (S), fracción precipitada (P) del homogenato de ovocito o la combinación de ambas (SP), en concentración equivalente a 15 ovocitos/pocillo. La proliferación se determinó mediante la incorporación de timidina tritiada. El mayor estímulo se obtuvo con FI seguido de IVM (16±1 y 11±0.5 veces de estimulación con respecto al Control). La fracción S de ovocitos FI y de IVM incrementó la síntesis de ADN (7±1.6 y 10±0.85 veces de estimulación respectivamente). Con la fracción P se observó menor efecto (FI: 3.3±0.4 y IVM: 3.2±2 veces de estimulación). Se concluye que los cambios en el efecto mitogénico del ovocito durante la maduración se deben a una disminución en la secreción de un factor soluble previamente sintetizado.

237. La apoptosis inducida por un análogo de GnRH en folículos preovulatorios de rata está asociada a un aumento en la expresión de la proteína bax. Fernanda Parborell, Adalí Pecci, Griselda Irueta, Marta Tesone.

Instituto de Biología y Medicina Experimental- CONICET, Facultad de Ciencias Exactas- UBA, Buenos Aires. mtesone@dna.uba.ar

Los análogos de GnRH ejercen un efecto directo sobre el ovario. En nuestro laboratorio hemos demostrado una inhibición de la esteroidogénesis en células de granulosa humanas y de rata. En este trabajo se estudió el efecto de la administración a ratas prepúberes superovuladas de un análogo de GnRH (Acetato de leuprolide, LA, 1 µg/rata durante 2 días) sobre la regulación de la apoptosis en folículos ováricos preovulatorios (FPO). Los FPO de ratas tratadas con LA muestran un aumento significativo en la fragmentación apoptótica del DNA medida por TUNEL (Control C: 0,65± 0,19; LA: 6,11± 1,41 células apoptóticas/campo) y por electroforesis en geles de agarosa (C: 450,5±10,5; LA: 1707,8±16,5 unidades arbitrarias). La expresión de genes de la familia de bcl-2 se estudió por Western blots. LA no afectó la expresión de bcl-2 (proteína antiapoptótica) luego de 0, 1 y 2 hs de incubación de los FPO en medio libre de suero. En cambio, en dichos tiempos de incubación, los niveles de bax (proteína proapoptótica) fueron mayores en los FPO de ratas tratadas con LA (0 hs: 50%; 1 h: 207%, 2 hs: 57%). Conclusión: La apoptosis inducida por LA en folículos preovulatorios estaría mediada en parte por cambios en la expresión de la proteína bax.

238. Endotelina 1 y su relación con el desarrollo luteal. Teresita Tognetti, Alejandra Estevez, Mariana Farina, Martha F. Gimeno y Alicia Motta.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO) CONICET. tognetti@overnet.com.ar

La expresión del mRNA para el receptor de endotelina-1 (ET1): el ETA como los niveles de ET1 aumentan, desde estadios medios del desarrollo luteal (Em) hacia los finales. En otros sistemas el ETA y el óxido nítrico (NO) se encuentran funcionalmente relacionados. En el presente trabajo se estudió la relación ET1 y NO en la producción de progesterona (P) y prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) por el ovario. Se utilizaron ovarios provenientes de ratas pseudopreñadas en Em. Analizamos el rol de ET1 incubando explantes de ovarios 1) con un

antagonista del ETA (BQ123: 10⁻⁶M) y 2) aumentando la concentración por medio del agregado exógeno de ET1 al medio de cultivo. Por radioinmunoensayo (RIA) se midieron los niveles de P y PGF_{2α} en los sobrenadantes. El BQ123 no afectó la producción de P pero disminuyó la de PGF_{2α} ovárica (control:179±5 vs BQ123: 96±10 pg/mg tejido), por lo que se dedujo que en Em, la ET1 endógena aumentaría la PGF_{2α} y no afectaría la P. El agregado de ET1 al medio de cultivo, disminuyó tanto la P (control:423±47 vs ET1 10⁻⁶M:292±26, 10⁻⁸M:130±27, 10⁻⁷M:222±3 ng/mg tejido) como la PGF_{2α} (control: 179 ± 5 vs ET1 10⁻⁶M: 58 ± 6, 10⁻⁸M:42 ± 8, 10⁻⁷M:68±9 pg/mg tejido). Por inmunoblot y con inhibidores de la óxido nítrico sintasa se vio que el NO sería un intermediario. Concluimos que distintos niveles de ET1 modularían la P y PGF_{2α} ovárica permitiendo mantener la "ciclicidad" de la función ovárica.

239. Participación del óxido nítrico en la síntesis de las prostaglandinas por membranas fetales humanas.

Mariana Farina, Alicia Motta, César Hernández Guerrero, Felipe Vadillo Ortega, Ana Franchi.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET), Instituto Nacional de Perinatología, México D. F. marifarina@yahoo.com

Es comúnmente aceptado que el inicio del parto a término está asociado a un aumento en la producción de prostaglandinas (PGs). La interacción entre las vías del óxido nítrico (NO) y las PGs ha sido demostrado en varios tejidos, incluyendo el útero y la placenta. En el presente trabajo se estudia si las vías del NO y las PGs interaccionan entre sí en membranas fetales humanas de mujeres sometidas a cesáreas programadas. Fragmentos de membranas corioamnióticas fueron cultivados durante 24 hs en presencia o ausencia de LPS (1 µg/ml), L-NAME (1 mM) y Meloxicam (10⁻⁷M), inhibidores específicos de la NOS y la COX-2 (ciclooxigenasa-2) respectivamente. En el sobrenadante se determinó la producción de PGE₂ y PGF_{2α} por RIA y de nitritos por Griess. El LPS produjo un aumento en la producción de PGF_{2α} (486±39 pg/ml vs C: 195 ± 36) y de la PGE₂ (2773±391 vs C: 1581±261). Este efecto fue bloqueado tanto por el L-NAME como por el Meloxicam. El LPS no modificó la síntesis de nitritos (8.2±0.8 µM vs. C: 8.0±0.6); la coincubación con L-NAME produjo una importante disminución (3.6±0.6). Estos resultados sugieren la participación del NO en la producción de PGs por las membranas corioamnióticas, en cuya síntesis estaría involucrada la COX-2.

240. Estudio de la actividad biológica de la proteína epididimaria DE expresada en bacterias. Ellerman Diego, Morgenfeld Mauro, Da Ros Vanina, Cohen Debora y Cuasnicú Patricia.

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET. Bs. As. (ellerman@dna.uba.ar)

La proteína epididimaria de rata DE participa en la fusión de gametas a través de sitios de unión en el ovocito. Tanto DE (227 aa), como 3 fragmentos de la misma (F1:aa 1-158, F2:156-227, F3:62-227), han sido expresados en un sistema bacteriano (rDE). Los objetivos del presente trabajo han sido: 1) comparar la actividad biológica de rDE respecto a la proteína nativa (nDE), y 2) identificar, a través del empleo de fragmentos, el dominio de DE capaz de inhibir el proceso de fusión. La actividad de nDE, rDE, F1, F2 y F3, se evaluó mediante su capacidad de inhibir la penetración de ovocitos de rata sin zona pelúcida. Los resultados indicaron que la ED₅₀ de rDE (10 µM) fue superior (p<0.05) a la de nDE (3.2 µM). Con el fin de investigar si la menor eficiencia de rDE se debía a una menor contenido de puentes disulfuro (S-S), se evaluó la presencia de SH libres en rDE y nDE por reacción con biotina-maleimida. Mientras nDE mostró una débil señal, una intensa marcación fue detectada en rDE. Por su parte, mientras F2 no logró inhibir el % de fertilización (76% vs 84% sin proteína), F1 y F3 produjeron una inhibición significativa (p<0.05)

(F1: 45% y F3 30%). En conjunto, se concluye que rDE presenta una actividad inhibitoria menor que nDE y una deficiente formación de S-S, sugiriendo la importancia de los mismos para la actividad de DE, y que la región responsable de la inhibición de la fusión se encontraría entre los aa 62-158.

HEMATOLOGIA III

241. Inhibición de la actividad del cofactor de ristocetina inducida por la presencia de EDTA. Adriana Woods, Ana Kempfer, María Silaf, Cristina Fariás, Silvia Grosso, Gonzalo Carballo, María Lazzari.

Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires. kempfer@connmed.com.ar

En una paciente con eritrodermia icctiforme, con embarazo de 18 semanas, se hizo estudio de coagulación. Para vWf:Ag, vWf:RCof y CBA se usó citrato con antiproteasas (EDTA, n-etilmaleimida, aprotinina). Resultados: APTT:48s(35-50s); VIII:62%; vWf:RCof:70%; vWf:Ag:90%. A las 30 semanas: APTT:40s; VIII:100%; vWf:RCof:20% (no corrige con plasma normal); vWf:Ag:140%; CBA:140%; multímeros de vWf: normales. A las 32 semanas: APTT:43s; VIII:90%; vWf:RCof: 120% (no corrige); vWf:Ag:145%; CBA:76%. A las 36 semanas: APTT:30s; VIII:96%; vWf:RCof:<10% (no corrige); vWf:RCof de plasma citratado:180%; vWf:Ag:175%; Al agregar calcio (5mM) al plasma con antiproteasas el vWf:RCof:110%. Al agregar EDTA (5mM) al plasma citratado, se obtuvo disminución del vWf:RCof, no así al agregar NEM o aprotinina. Después del parto los resultados fueron normales. Conclusión: aunque el plasma para vWf:RCof debe obtenerse con antiproteasas (para impedir proteólisis in vitro del vWf), en muestras con EDTA de esta paciente, a partir de las 30 semanas de embarazo, se detectó actividad inhibitoria sobre el vWf:RCof y discordante con respecto del vWf:Ag, y CBA. Cabe preguntarse si se requiere una concentración de calcio basal para la determinación de vWf:RCof y por ende para la evaluación de la interacción del dominio A1 con la GPIb.

242. Multímeros extragrandes del factor von Willebrand en embarazadas del tercer trimestre normales. Cristina Fariás, Ana Kempfer, Analía Sanchez Luceros, María Silaf, Adriana Woods, Gonzalo Carballo, María Lazzari.

Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. CONICET. farias@connmed.com.ar.

En plasma normal existen multímeros grandes, intermedios y chicos del factor von Willebrand (vWf). Los multímeros extragrandes del vWf sólo se observan en plaquetas, células endoteliales y plasma de algunos pacientes con enfermedad de von Willebrand, púrpura trombocitopénica trombótica y síndrome urémico hemolítico. Durante el embarazo, los niveles de vWf y FVIII se elevan, presumiblemente debido a efectos hormonales y disminuyen después del parto. Existen multímeros extragrandes en muestras fetales, de cordón umbilical y en neonatos y no existen en muestras post-parto. Nuestro objetivo fue semicuantificar los multímeros extragrandes del vWf en muestras de embarazadas del tercer trimestre normales. Estudiamos 34 embarazadas normales teniendo en cuenta la historia clínica personal y familiar. Evaluamos los parámetros: FVIII, vWf:Ag, actividad del cofactor de ristocetina, enlace del vWf al colágeno y desarrollamos el análisis multimérico del vWf a baja resolución con corrección de la concentración. descritos. Se detectaron multímeros extragrandes en 3 (45±15%, 60±18, 57±12 (n=4)) de las 34 embarazadas, no encontrándose diferencias significativas comparando los otros parámetros evaluados. En estos 3 casos, existiría una anomalía en el vWf ó en la actividad de la proteasa que cliva al vWf.

243. Estudio de la viscosidad sanguínea en ratas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Héctor Berra¹, Eliane Piaggio², Silvia Revelli², Alejandra Luquita³.

¹Cát. de Fisiología, ²Inst.de Inmunología, ³Cat. Biofísica. Facultad Ciencias Médicas. UNR. e-mail: luquitale@hotmail.com

La etiopatogenia de la miocardiopatía chagásica ha sido atribuida a factores microvasculares, entre otros. Los mismos serían productores de fenómenos isquémicos focalizados en el miocardio. La hiperviscosidad sanguínea constituye, en tal sentido, un factor de riesgo. El objetivo de este trabajo fue estudiar la viscosidad sanguínea (η_s) en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi* (Tc). A los 7 y 14 días postinfección (p.i.) se contaron las parasitemias (ps) y junto a un grupo control (C) se dosó la concentración de proteínas plasmáticas (pp). Se utilizaron machos, de línea "I" infectados al destete por vía subcutánea con 10⁶ tripomastigotes de la cepa Tulahuén. La ps fue más alta al día 7 (grupo A): 65.3 ± 28.5 (n=20) con respecto al día 14 (grupo B): 2.4 ± 1.1 (n=19, 100 campos de 45 x 10; p< 0.001). Las pp en B fueron más altas que en A (B: 6.1 ± 0.7; A: 4.9 ± 0.3 g/dl; p< 0.05). A y B tuvieron viscosidades plasmáticas (η_p) mayores que C (A: 1.29 ± 0.23; B: 1.34 ± 0.15; C: 1.21 ± 0.19 (n=18) mPa.s; p<0.05). A su vez η_s fue más elevada, coincidiendo con un aumento del hematocrito (H) en B (3.8 ± 0.7 mPas, H: 29.4 ± 3.3) que en C (3.4 ± 0.57; H: 28 ± 3.7 p<0.05). Mientras que en A (3.5 ± 0.5, H: 28.1 ± 3.7) no difirió significativamente. La infección con Tc muestra un aumento de la η_{hs} y la η_{hp} . Esta última acompañada de un aumento en ps día 7pi y en la concentración de pp día 14 pi.

244. Nuevo sistema para desplegar al factor von Willebrand favoreciendo la acción de la proteasa que cliva al factor von Willebrand. Ana Kempfer, Cristina Fariás, Gonzalo Carballo, María Silaf, María Amaral, María Lazzari.

Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. CONICET. kempfer@connmed.com.ar.

Previamente hemos reportado una sustancia (proteasa) que cliva al factor von Willebrand (vWf) en las condiciones de la microcirculación. Se ha encontrado que esta proteasa está ausente ó disminuída en pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica familiar (PTT) (deficiencia en la síntesis) ó no familiar (inhibidor). Existen dos mecanismos para desplegar el vWf (forma sobre la que actúa la proteasa): perfusión de las muestras a alta fuerza de cizallamiento (A) y siembra de las muestras sobre filtros de nitrocelulosa suspendidos en una solución de urea (B). Nuestro objetivo fue, utilizando el mecanismo B, hallar un sistema más simple en el cual la muestra interactúe con urea y para que la obtención del producto sea infalible. Las muestras se colocaron en membranas de diálisis (B1). La incubación en la solución de urea se realizó durante 24 h. a 37 °C. Se desarrollaron curvas con muestras ultrasonificadas de 6 normales diluídos de 1/5 a 1/40 y una muestra de un paciente con PTT no familiar ultrasonificado diluído 1/5, a las que se les agregó vWf purificado. La desaparición de los multímeros de vWf es un índice de la actividad proteásica. Utilizando B1 se obtuvieron perfiles multiméricos similares a B para las diluciones de las curvas de los normales y del paciente. La actividad proteásica del paciente (25%) fue similar en A, B y B1 (n=4). El sistema utilizado es tan adecuado como A y B y más eficiente para la cuantificación de la actividad proteásica.

245. Comportamiento del TNF-alfa y fibrinógeno en artropatías microcristalinas tratadas con Láser de He-Ne. Vilma Campana, Mónica Moya, Antonio Gavotto, Juan Simes, Luis Spitale, Hugo Juri, José Palma.

*Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.
e-mail: campanav@hotmail.com*

Las artropatías microcristalinas tienen en común la respuesta inflamatoria asociada a cristales como el pirofosfato cálcico (PC), causante de la condrocalcinosis. El fibrinógeno (F) y el Factor de necrosis tumoral (TNF- α), mediadores de la inflamación y la inmunidad, han sido determinados en plasma de ratas con artropatías por PC, para evaluar el efecto antiinflamatorio de la terapia con Láser de He-Ne y su estudio anatomopatológico (AP) en las articulaciones. En un 1º grupo se inyectó PC en ambas articulaciones de los miembros posteriores. El 2º grupo: control. En el 3º grupo se trató con Láser sobre las articulaciones inyectadas con PC. Se determinó en plasma TNF- α (pg/dl) por Elisa y F(mg/100ml) por espectrofotometría y las articulaciones fueron seccionadas para el estudio AP. En el 1º grupo se produjo igual incremento significativo ($p < 0.01$) de los niveles de F(304.3 ± 0.7) y del TNF- α (18.1 ± 0.9) al compararlo con el grupo control (2º grupo) F: (210.3 ± 5.1) y TNF- α (3.76 ± 0.9). Al comparar el F (198.9 ± 3.7) del 1º con el 3º grupo se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$), sin existir diferencia significativa con respecto al TNF- α (15.7 ± 3.1). Se observó en la AP del 1º grupo reacción inflamatoria, proliferación fibro y angioblástica, con estroma laxo edematoso; sin lesiones en el 3º grupo. El tratamiento con Láser de He-Ne en artropatías microcristalinas tendría efecto antiinflamatorio evaluado por los niveles de F e involución de los cambios histológicos.

246. Secuencias repetitivas capaces de aumentar la persistencia de proteínas en sangre. Paula Alvarez, Mariana Vila Perez, Tamara Pitcovsky, Oscar Campetella.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas. Universidad Nacional de San Martín. (oscar@iib.unsam.edu.ar)

Trypanosoma cruzi posee gran cantidad de antígenos repetitivos de función biológica no esclarecida. En la familia de la *trans*-sialidasa (TS), enzima clave en el proceso de invasión celular de *T. cruzi*, se encuentran los antígenos 13 y SAPA (con repeticiones en tandem de 5 y 12 aa respectivamente). Utilizando un vector aceptor que contiene la TS, se demostró que los antígenos 13 y SAPA producían persistencia de TS en sangre (vida 1/2: 38 y 40 h, vida 1/2 de TS sin repeticiones: 7 h). Con el fin de estudiar los requerimientos de una proteína para perdurar en circulación, diseñamos una secuencia repetitiva (A26: DPSTA) en base a la comparación de ambos antígenos. A26 clonada al C-terminal de la TS también aumentó su vida media en sangre a 38h. Para determinar los aa involucrados, se realizaron modificaciones puntuales en la secuencia A26 observándose que un cambio D por K reduce la vida media en sangre a sólo 1 hora. También se evaluó la importancia de la distancia de las prolinas presentes en A26, para ello se construyeron quimeras conteniendo P distanciados 10 aa en lugar de 5. La vida media de estas quimeras fue similar a la observada para TS-A26. Este trabajo nos permitió identificar una secuencia mínima de aa que confiere capacidad de aumentar la persistencia en sangre de una proteína.

247. Cambios en el espectro de absorbancia de la hemoglobina (Hb) de eritrocitos humanos (HE) determinados por modificaciones del pH intraeritrocitario (pHi). Adriana Silvestro; Inés Demaría; Amalia Videla; Rut Agüero.

*Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.
e-mail: raguero@citynet.net.ar*

El pH celular puede alterarse en diversas condiciones fisiopatológicas. En el presente trabajo se evaluó la sensibilidad de los cambios espectrales de la Hb intraeritrocitaria y libre frente a modificaciones del pHi. Los HE, obtenidos por punción venosa de donantes voluntarios ocasionales, fueron lavados e incubados durante 50 min en medios HEPES-NMG

(HENMG) o HEPES-Na⁺ (HENa⁺), cuyos pHe oscilaron entre 6,3 y 7,4. Se efectuaron barridos de espectro de absorbancia (600–400 nm) por duplicado de las suspensiones de HE enteros en los medios respectivos (Hcto. final 0,015%) y de alícuotas de HE de Hcto. similar lisadas por incorporación de Tritón X-100 al medio. En los HENa⁺ se identificaron dos picos espectrales: 418 nm y 468 nm, mientras que en los HENMG el pico 418 se incrementó a expensas del 468 (apenas visible). Las lecturas fueron corregidas por turbidez y cambios de volumen globular utilizando la lectura a 590 nm (Abs_{418/590}). Se observó correlación ($p < 0,05$) entre la Abs_{418/590} y el probable pHi en ambos grupos de HE. La pendiente de regresión obtenida (unidad de Abs_{418/590}/unidad pHe) fue: ($X \pm ES$; n): HENMG ($-0,076 \pm 0,02$; 9); HENa⁺ ($-0,094 \pm 0,02$; 5). El pico 468 no se correlacionó con el pHi. La Hb libre mostró un espectro similar a la intraeritrocitaria con desplazamiento de los picos a 414 y 464 nm respectivamente. No se observó en este caso correlación con el pHe. Se concluye que el pico de absorbancia de Hb (418) constituiría una buena señal del pHi y que las modificaciones espectrales que determinan su sensibilidad dependen del mantenimiento de la estructura globular.

TRANSDUCCION DE SEÑALES II

248. Transporte de calcio en microsomas de glándula submandibular de rata. Mariano Ostuni, Débora González, Guillermo Alonso.

Cátedra de Biofísica. Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires. (mariano@biofis.odon.uba.ar)

En trabajos anteriores hemos demostrado que en microsomas de glándula submandibular de rata la actividad ATPásica y la captación de Ca²⁺ no se correlacionan. El objetivo del presente estudio es demostrar que la captación de Ca²⁺ se realiza a través de ATPasas del tipo SERCa. Las preparaciones de los microsomas y de las células acinares se realizaron mediante técnicas de centrifugación diferencial y digestión enzimática. La captación se estudió mediante filtración de vesículas incubadas con ⁴⁵Ca(CaCl₂). El calcio citosólico se monitoreó usando la sonda Fluo3/AM en un microscopio confocal. La captación fue dependiente de ATP y el calcio acumulado se perdió rápidamente al agregar calcimicina. El orto-vanadato y la thapsigargina (Tg) inhibieron significativamente la captación de Ca²⁺ (22 ± 2 vs. $2 \pm 0,3$ y $1 \pm 0,2$ nmol/mg respectivamente $P < 0,01$), mientras que con azida sódica sólo se logró una inhibición máxima del 66% (22 ± 2 vs. $7,5$ nmol/mg, $P < 0,05$). En presencia de Tg 2 μ M, las células acinares modificaron su respuesta a carbachol, registrándose un patrón oscilatorio lento en los niveles de calcio citosólico. Si bien en las glándulas submandibulares coexisten distintos tipos de ATPasas serían las SERCa las responsables de la captación y restauración del calcio citosólico a sus niveles pre-estímulo.

249. Regulación de los niveles de ARNm de una Acil-CoA Tioesterasa que libera Acido Araquidónico en tejido cardíaco. Isabel Neuman, Paula Maloberti, Constanza Lisdero, Juan José Poderoso, Ernesto Podestá.

Departamento de Bioquímica Humana y Laboratorio del Oxígeno. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. (ineuman@fmed.uba.ar).

En trabajos previos comprobamos la existencia de un mecanismo alternativo de regulación de las concentraciones de ácido araquidónico (AA) intracelular a través de una tioesterasa específica para acil-CoAs de cadena larga. Esta enzima denominada ARTISt (Arachidonic acid- Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis) está regulada hormonalmente y se expresa tanto en tejidos esteroideogénicos como no esteroideogénicos. Previamente demostramos que en tejido cardíaco, Isoproterenol (Iso) produce una activación dosis-de-

pendiente de la enzima mediada por receptores beta-adrenérgicos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la regulación de los niveles del ARN mensajero de ART1St en tejido cardíaco. La perfusión cardíaca con Iso (10^{-7} M) incrementó la presencia del transcripto (1,4; 1,6 y 2,6 veces a los 15, 30 y 60 min), efecto que fue bloqueado por la perfusión previa con propranolol (10^{-5} M). Los niveles del transcripto disminuyeron cuando las ratas fueron inyectadas con actinomicina D (500 ug/kg). Por otra parte, la abundancia del ARN mensajero de ART1St aumentó cuando las ratas fueron sometidas a ayuno pero no cuando fueron tratadas con proliferadores de peroxisomas. Estos resultados sugieren un control temprano de la transcripción de ART1St en corazón mediado por receptores beta-adrenérgicos. Dado que en tejidos esteroideogénicos el AA liberado por esta vía regula la transcripción de genes, el rol de ART1St cardíaco podría estar localizado también a nivel transcripcional.

250. Rol de los Glucocorticoides como intermediarios de mecanismos de transducción de señales que intervienen en el disparo o protección de apoptosis. Lorena Franco, Monica Costas & Omar Coso.

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA e-mail coso@bg.fcen.uba.ar.

Es conocido el antagonismo mutuo entre el receptor de glucocorticoides (GR) y los factores de transcripción inducidos por citoquinas (AP-1, NF-kB). Se sabe también, que los glucocorticoides (GC) protegen de la apoptosis inducida por TNF- α a células naturalmente sensibles. Así mismo hay evidencias que demuestran que, in vitro, el GR es fosforilado por proteínas quinasas activadas por citoquinas. De acuerdo con estas observaciones nos propusimos estudiar: 1) Si el GR es sustrato de quinasas inducidas por TNF- α , entre las que se encuentran la familia de las MAPKs y 2) El rol de los GC en la apoptosis inducida por TNF- α en células Hela (insensibles al mismo) sensibilizadas con cicloheximida. Se encontró que las MAPKs ERK-1/2, así como JNK y p38/HOG fosforilan a una proteína de fusión GR-GST en respuesta a TNF- α (5 ng/ml). A diferencia de lo observado en células naturalmente sensibles, los GC no ejercen ningún rol protector sobre la apoptosis disparada por TNF- α (50-0,123 ng/ml) en células Hela sensibilizadas con dexametasona (500-10 nM). Sin embargo, en ese sistema, los GC bajan la actividad transcripcional kB-Luc. Esto nos permite concluir que esta última no es la única señal involucrada en la protección de apoptosis inducida por TNF- α y sugiere centrarnos en como los cambios en la fosforilación del GR por TNF- α podrían afectar su función.

251. EPAC: Un nuevo factor intercambiador de GTP (GEF) involucrado en la activación de las c-Jun quinasas (JNKs). Daniel Hochbaum#, Daniel Altschuler* & Omar Coso#.

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA (#) y University of Pittsburgh () (coso@bg.fcen.uba.ar).*

La regulación de numerosas funciones celulares depende del funcionamiento de sistemas transductores de señales. Entre estos, las cascadas de MAP quinasas (MAPKs), reciben señales a través de una serie de adaptadores que incluyen una pequeña proteína que une GTP (proteínas G) y su correspondiente GEF. La pequeña proteína G Ras participa de la transducción hacia la MAPK Erk-2 y en mucha menor medida hacia JNK. En contraste, Rac, Cdc-42 y sus correspondientes GEFs, Dbl y Ost, son fuertes activadores de JNK y no activan Erk-2. EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) es un GEF específico para las proteínas G Rap1 y Rap2. En esta presentación mostramos pruebas de que EPAC es capaz de activar el camino de las JNKs por sobreexpresión en células HEK-293-T. Dicha activación es resistente a la cotransfección

con formas dominantes negativas de Rac y Ras (mutantes N17) y es bloqueada por un Rap1N17, lo que evidencia que utiliza una vía alternativa a las descriptas. La falta de activación de JNK por un mutante constitutivamente activo de Rap1 (G12V) nos impide asegurar por el momento que la señalización de EPAC a JNK utilice a Rap1 como mediador. De todos modos el cúmulo de evidencias encontradas nos permiten concluir que EPAC y JNK constituyen los eslabones extremos de una nueva cascada de señalización que vincula GEFs y MAPKs.

252. El óxido nítrico (NO) afecta la síntesis de inositol trifosfato en la adenohipófisis de rata. Miguel Velardez, Beatriz Duvilanski.

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. neuroend@fmed.uba.ar

El NO disminuye la concentración intracelular de calcio e inhibe la actividad de la lipooxigenasa, mecanismos intracelulares involucrados en el efecto inhibitorio del NO sobre la secreción de prolactina. El inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) estimula la movilización de calcio y la secreción de prolactina en respuesta a la acción de diversos secretagogos, tales como TRH y angiotensina II (AII). En el presente trabajo estudiamos el efecto del NO sobre la concentración de IP_3 (por cromatografía de intercambio iónico) en cultivos de células adenohipofisarias de ratas machos. DETA NONOato (D, 1 mM), dador de NO, redujo la estimulación inducida por AII (10^{-8} M) sobre los niveles de IP_3 . Control: 0.68 ± 0.03 % de radioactividad incorporada, D: 0.60 ± 0.03 , AII: 1.62 ± 0.08 , AII + D $1.19 \pm 0.13^*$, * $p < 0.05$ vs control sin DETA (n=5). Dicho efecto fue revertido por hemoglobina (Hb, 10^{-5} M), AII + D + Hb: $1.40 \pm 0.05^*$, # $p < 0.05$ vs AII + D. DETA también disminuyó el efecto estimulador de TRH (10^{-7} M) sobre la concentración de IP_3 , efecto que no fue observado en presencia de DETA sin capacidad de liberar NO (DETA decaído, 1 mM), TRH: 4.03 ± 0.45 , DETA decaído: 3.98 ± 0.29 . Nuestros datos indican que el NO reduce parcialmente el aumento de IP_3 inducido por TRH y AII. Esta disminución podría estar involucrada en el efecto inhibitorio del NO sobre la liberación de prolactina.

253. Modificaciones inducidas por nitroprusiato y plasma-rico-en-plaquetas en el epitelio pigmentario de la retina. Valeria Cantó Soler y Angela Suburo.

Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral. Pilar, Pcia. de Buenos Aires (B1664INZ). e-mailvcanto@cas.austral.edu.ar

En la proliferación vitreoretinal, se forman membranas epirretinales por migración de las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE). Previamente demostramos que las membranas humanas expresan isoenzimas de la NO sintasa y que lo mismo ocurre en membranas inducidas en conejo por plasma-rico-en-plaquetas (PRP). Para evaluar el rol de NO sobre la integridad epitelial, estudiamos los efectos de nitroprusiato sódico (NPS, un dador de NO) y PRP sobre dos proteínas de las uniones estrechas. **Métodos.** Explantos de RPE de ratones BALB-c fueron incubados de 0 a 3 hs en solución de Puck o medio RPMI con NPS (5 nM a 25 mM), PRP o plasma-libre-de-plaquetas (PLP), analizándose la inmunoreactividad de ZO1 y ocludina (ZO-IR, OC-IR). **Resultados.** En condiciones basales, ZO-IR marca las células RPE con un patrón poligonal uniforme. El RPE no presenta OC-IR, aunque sí lo hace el endotelio vascular. A las 3 hrs el patrón normal de ZO-IR sólo se preservó en explantos incubados en NPS 0,5 mM o PLP. Otras concentraciones de NPS distorsionaron el patrón epitelial normal. PRP indujo desaparición de ZO-IR en algunas células, que sin embargo presentaron OC-IR intracitoplasmática. **Conclusiones.** PLP y NPS 0,5 mM protegen las uniones intercelulares, sugiriendo que NO podría contribuir a la integridad epitelial. Esta es distorsionada por PRP, que además produce una traslocación citoplasmática de ocludina.

254. Inhibición presináptica inducida por la adenosina en distintas concentraciones de potasio externo.

Adriana Losavio, Silvana De Lorenzo, Salomón Muchnik.

Laboratorio de Neurofisiología. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. (alosavio@mail.retina.ar)

Con el propósito de estudiar la inhibición presináptica (IP) de la liberación espontánea de ACh en distintas concentraciones de K⁺ externo, se analizó el efecto de la AD 100 μM y/o de un agonista específico de los receptores A1 2 cloro-N6-ciclopentil adenosina (CCPA 100 μM) sobre la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPPs) registrados en músculo diafragmático de ratones CF1. En Ringer normal (RN, K⁺ 5 mM) la AD produjo una disminución (↓) de la fMEPPs del 37.0 ± 5.9% (n: 6) y la CCPA del 46.7 ± 5.8% (n:6). En K⁺ 1 mM se observó una ↓ de la fMEPPs del 49.4 ± 9.9% con respecto al RN y el agregado de CCPA indujo una ↓ de fMEPPs del 26.0 ± 8.1% (n:6) con respecto a la observada antes de su aplicación. En K⁺15 mM la fMEPPs se elevó un 721.9 ± 158.4% (n:4) con respecto al RN, pero en estas condiciones el agregado de CCPA no indujo IP (↓ de fMEPPs del -5.9 ± 13.9%, n:4). Para verificar si en K⁺ 15 mM prevalece la acción excitatoria de la AD a través de sus receptores A2 también se realizaron experimentos con AD, siendo los resultados similares a CCPA (↓ de fMEPPs del 3.2 ± 21.1%, n:4). Con el fin de evaluar si la falta de IP de CCPA y AD en K⁺ 15 mM, se debe a que la AD endógena ocluye el efecto de la AD exógena, se midió fMEPPs en presencia del antagonista específico A1, 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX 1μM). En RN, DPCPX no modificó fMEPPs pero en K⁺ 15 mM DPCPX incrementó fMEPPs drásticamente (11876.0 ± 5141.8%, n=3). Estos resultados sugieren que en K⁺ 15 mM el ATP liberado junto a la ACh se degradaría a AD ocupando los receptores A1 ocluyendo la acción de AD exógena, regulando de esta manera la excesiva liberación de neurotransmisor y posterior agotamiento de la terminal nerviosa.

255. Presencia de MDR (multidroga resistencia) y del regulador de la conductancia de la fibrosis quística (CFTR) en células K562. Yanina Assef, Carlos Kusnier, Alicia Damiano, Cristina Ibarra y Basilio A Kotsias.

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (kotsias@mail.retina.ar).

La distribución de la proteína MDR (multidroga resistencia) es complementaria a la del regulador de la conductancia de la fibrosis quística (CFTR). Nuestros objetivos fueron identificar estas proteínas en la línea celular K562 proveniente de una leucemia mielóide crónica humana y luego correlacionar su presencia con los canales iónicos presentes en las mismas. Para ello se purificó el ARN total y por RT-PCR, utilizando sondas que flanquean secuencias de nucleótidos altamente conservadas para cada uno de los genes, se amplificaron dichas secuencias. Se observó la presencia de bandas correspondientes a las secuencias amplificadas de CFTR y MDR1. Con «patch-clamp» (configuración «cell-attached») (n=5) con soluciones simétricas en la pipeta y en la solución extracelular (140 NaCl) se identificó un canal que fue activado por el agregado de forskolina (40 μM). Luego de la excisión de estos parches activados, las transiciones de corriente indicaron un canal con una conductancia de 38 pS no altamente rectificante (n=6). El potencial de reversión (Er) mostró un corrimiento hacia valores más negativos luego del reemplazo del Cl⁻ por gluconato, con una perm-selectividad gluconato/Cl de 0.32 ± 0.06. El reemplazo del Na⁺ por NMDG (n=5) no modificó el Er. Nuestros resultados sugieren que las características de los canales iónicos observados podrían ser atribuidos a un comportamiento no descrito del CFTR y/o MDR en ovocitos de Bufo. Sin embargo los experimentos realizados no permiten descartar si se trata de un canal aniónico aún no identificado.

256. Corrientes de Na⁺ y activable por ionóforos de Ca²⁺ en ovocitos nativos de Bufo arenarum. Sebastián Godoy, Juan Piantino, Cristina Ibarra, Horacio Cantiello, Basilio A. Kotsias.

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina e Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires. (kotsias@mail.retina.ar).

El objetivo fue el de caracterizar las corrientes de Na y las inducibles por el aumento en la concentración intracelular de Ca en ovocitos nativos de Bufo arenarum, disociados con colagenasa y estudiados mediante técnicas de voltage clamp con dos microelectrodos. Se aplicaron pulsos hiper y despolarizantes de 3 seg de duración desde -100 hasta 60 mV a partir de un potencial de base de -60 mV ó -40 mV. Los datos fueron registrados y analizados utilizando el programa Pclamp. En la solución control (96 mM NaCl) los pulsos hiperpolarizantes generan corrientes lineales mientras que a partir de 0 mV, se observan corrientes cada vez mayores que dan lugar a una rectificación saliente, con dos componentes de corriente saliente, uno inicial seguido de otro que se incrementa con el tiempo. El reemplazo del Na extracelular por NMDG en la solución extracelular dió lugar a una disminución en la corriente basal de -139 ± 11 a -73 ± 31 nA (SD, n=6) y una conductancia de 3.3 ± 0.4 a 1.8 ± 0.8 uS. Estas corrientes despolarizantes no fueron bloqueadas por amiloride (50-100 μM). La aplicación de ionóforos de Ca como A23187 o ionomicina (.5-2 μM) aumenta las corrientes observadas en solución control en tanto que la exposición previa a O-Ca (200 μM BAPTA) sólo elimina parcialmente el efecto observado. Estos resultados sugieren la presencia de una corriente despolarizante de Na no sensible al amiloride y que los depósitos de Ca intracelulares son suficientes para mantener las corrientes activables por Ca.

257. La deficiencia de estrógenos modifica el efecto del 17-Beta Estradiol sobre el tejido vascular de rata.

Juana Selles, Nérida Polini, Cristina Alvarez, Virginia Massheimer.

Cátedra de Análisis Clínicos. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. E-mail:massheim@uns.edu.ar Presentado por el Dr. Rodolfo Puche

La terapia hormonal de reemplazo en posmenopausicas tiene efectos beneficiosos a nivel lipídico y vascular, disminuyendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares. El tratamiento «in vitro» con 17beta E₂ (10⁻⁸-10⁻¹⁰ M), por tiempos muy cortos de (1-5 min.), de anillos de aorta de ratas hembras con niveles normales de estrógenos, incrementa la producción de NO (0.98 vs 2.45 pmol/mg prot. control vs tratado P < 0.05). El NO producido fue determinado por la conversión de ³H arginina en NO y ³Hcitrulina. Este efecto fue específico para 17betaE₂, y Progesterona, ya que no se observó con 17alfaE₂ (análogo inactivo) y Testosterona. El inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME (10⁻⁴-10⁻⁶M) suprimió totalmente el estímulo inducido por la hormona. Los anillos de aorta incubados en un plasma rico en plaquetas, y tratados con 17beta E₂ (10⁻⁷-10⁻⁹M) durante 1 min., produjeron una inhibición de la agregación plaquetaria inducida con ADP (10⁻⁵M) de 68%, que también fue bloqueado por tratamiento con L-NAME. El tejido vascular proveniente de ratas deficientes de estrógenos (comprobado con citología exfoliativa) tratado con 17beta E₂(10⁻⁸-10⁻⁹M), no incrementó la producción de NO (1.35 vs 1.16 del control n.s), tampoco indujo efecto antiagregante. Similares efectos se observaron con ratas ovariectomizadas. Estos resultados aportan evidencias de una alteración del mecanismo de acción rápida del 17betaE₂ a nivel del tejido vascular inducido por la privación de estrógenos.

258. El óxido nítrico y las prostaglandinas participan en el mecanismo de acción de la progesterona sobre el tejido vascular. Virginia Massheimer, Nérida Polini, Cristina Alvarez, Juana Selles.

Cátedra de Análisis Clínicos. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. e-mail: massheim@uns.edu.ar Presentado por el Dr. Rodolfo Puche

El óxido nítrico (NO) y las prostaglandinas (PG) son reguladores de la contracción-relajación arterial y del proceso de agregación plaquetaria bajo la influencia de diferentes mediadores químicos, entre ellos las hormonas gonadales femeninas. Utilizando anillos de aorta de ratas hembras, evaluamos la acción de Pg, a tiempos muy cortos de tratamiento (1-5 min.), sobre la producción de NO endotelial y la agregación plaquetaria (AP). Pg 10^{-9} M – 10^{-7} M incrementa la producción de NO (1.02 vs 1.90 pmol/mg prot., control vs tratado $P < 0.05$). L-NAME 10^{-5} M (inhibidor de la óxido nítrico sintasa) suprimió totalmente el estímulo inducido por Pg. Anillos de aorta se incubaron en un plasma rico en plaquetas, se expusieron a Pg 10^{-8} M (1 min.) y se indujo la AP con ADP 10^{-5} M. Se observó que la AP fue inhibida en 80%, evento bloqueado por L-NAME, sugiriendo la participación del NO en el efecto antiagregante inducido por Pg. La antiagregación se observó también para 17-beta estradiol, no así para 17-alfa-estradiol ni testosterona (10^{-6} - 10^{-9} M). En estudios de captación de arginina radiomarcada la Pg no alteró el influjo de arginina al tejido arterial (76.40 ± 6.1 vs 82.5 ± 7.4 pmol arg./ mg prot. control vs tratado). La inhibición de la síntesis de PG con indometacina 10uM suprimió el efecto estimulador de Pg sobre NO. Este trabajo aporta evidencias de una acción directa, no genómica de Pg sobre el tejido vascular a través de un mecanismo que participan el NO y las prostaglandinas.

COMUNICACIONES ORALES

ENDOCRINOLOGIA IV

- 259. Diferencias sexuales en las alteraciones músculo-esqueléticas de pacientes celíacos.** José Ferretti, Roberto Mazure, Patricio Tanoue, Alicia Marino, Gustavo Cointry, Horacio Vázquez, Sonia Niveloni, Silvia Pedreira, Eduardo Mauriño, José Zanchetta, Julio Bai.

Centro de Estudios de Metabolismo Fosfo-Cálcico, Univ. Nacional de Rosario; Fac. de Medicina, Univ. del Salvador; Inst./Fund. de Investigaciones Metabólicas, y Hospital «Udaondo». (gcointry@arnet.com.ar)

Con el fin de analizar la patogenia de la osteopatía celíaca, se realizaron análisis tomográficos (QCT, pQCT) y bioquímicos de 21 celíacos (6 hombres y 15 mujeres) de 21-56 años, al diagnóstico y tras 1 año de dieta sin gluten, y 350 controles normales de 6 a 87 años. La enfermedad redujo el Ca y la 25-OH-D₃ séricos; el área, el contenido y la densidad mineral volumétrica (CMO, vDMO), los momentos de inercia (MI, indicadores arquitectónicos) y los índices de resistencia ósea (BSI) de la región cortical radial. La PTH sérica, inversa a la calcemia, correlacionó con 3 indicadores del turnover óseo ($p < 0.01$). Los MI y BSI fueron más afectados en los hombres ($p < 0.01$) y rebeldes al tratamiento. En las mujeres los MI variaron poco y bajó más la vDMO total, que la dieta corrigió. Los valores basales y los cambios en las áreas musculares de muslo y psoas correlacionaron con los de la vDMO trabecular vertebral y cortical del cuello femoral, respectivamente ($p < 0.05$). Esto evidencia una patogenia doble para esa osteopatía: 1. la *respuesta paratiroidea* a la hipocalcemia aumentaría el turnover óseo afectando la calidad mecánica cortical (reversible y más evidente en las mujeres); y 2. el *debilitamiento muscular* (baja estimulación mecánica esquelética) afectaría el desarrollo metafisario (menos reversible y más evidente en los hombres).

- 260. Efecto de la leptina sobre las gonadotropinas y su factor liberador durante la maduración sexual.**

Oswaldo J. Ponzo, Berta Szwarcfarb, Silvia Carbone, Roxana Reynoso, Dora Rondina, Pablo Scacchi, Jaime Moguevsky.

Instituto de Fisiología, Fac. de Medicina, Universidad de Bs.As. jmoguile@mail.fmed.uba.ar

Publicaciones recientes demuestran que, la hormona adipocitaria leptina tendría un efecto favorecedor de la función reproductora. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de diferentes dosis de leptina sobre los parámetros neuroendocrinos del eje reproductor. Se determinó las concentraciones de LH, FSH y LHRH en homogenatos hipofisarios e hipotalámicos de ratas hembra de 15 (prepúberes) y 30 (peripúberes) días de edad ($n = 8-12$), 1 hora después de la administración (i.p.) de leptina recombinante, en las dosis de 30, 100 y 300 ug/kg. En animales de 15 días las dosis de 30 y 100 ug/kg incrementaron significativamente ($P < 0,001$ y $P < 0,02$) la concentración hipofisaria de LH (Control: $80,94 \pm 15,89$; 100 ug/kg: $162,56 \pm 25,13$; 30 ug/kg: $225 \pm 24,3$ ng/mg tejido). En ratas de 30 días sólo la dosis de 30 ug/kg incremento significativamente ($P < 0,05$) los niveles hipofisarios de LH (Control: $249,5 \pm 44,09$; 30 ug/kg: $376,51 \pm 26,17$ ng/mg tejido). Ninguna de las dosis de leptina utilizadas modificaron la concentración de FSH en hipofisis de ratas de ambas edades. La concentración hipotalámica de LHRH, solamente se incrementó significativamente ($P < 0,005$) en ratas de 15 días con la dosis de 30 ug/kg (Control: $9,45 \pm 1$; 30 ug/kg: $15,04 \pm 1,06$ pg/mg tejido). Estos resultados indicarían que la leptina favorece la síntesis de LH y LHRH en ratas hembra prepúberes.

- 261. Incremento de la secreción de hormona de crecimiento (GH) en adolescentes con poliquistosis ovárica (PCO).** MC García Rudaz¹, MG Ropelato¹, ME Escobar¹, JD Veldhuis², M Barontini¹.

¹Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños R Gutiérrez. Buenos Aires. Argentina.

²Department of Internal Medicine, University of Virginia, Health Sciences Center. Charlottesville, Virginia, USA.

Se evaluaron las características de la secreción espontánea de GH y su relación con la de LH en adolescentes con PCO. Se estudiaron 9 PCO (13-20 años) y 9 controles (C) eumenorreicas (13-19 años, índice de masa corporal (IMC) similar). Se obtuvieron muestras de sangre cada 20 min. durante 12 h. nocturnas. Se determinó GH por IFMA específico para la forma 22 Kd (Delfia, Wallac). La secreción de GH y LH se evaluó por análisis de deconvolución. La concentración media de GH en 12 h., la masa secretada por pulso y la frecuencia de pulsos fue similar en ambos grupos. Se observó un incremento de la tasa de producción de GH (PCO: 40.9 ± 5.8 vs. C: 30.0 ± 4.2 ug/L/12-h, $p < 0.05$) a expensas de las PCO con IMC normal. Las PCO mostraron una disminución significativa de la ApEn (0.57 ± 0.02), es decir una secreción de GH más ordenada en relación al grupo control (0.65 ± 0.03 , $p < 0.01$). La concentración media de GH correlacionó positivamente con la concentración media de LH ($r = 0.79$, $p = 0.02$), con la masa de LH secretada por pulso ($r = 0.91$, $p = 0.0019$) y con los niveles de androstenediona ($r = 0.73$, $p = 0.041$) sólo para el grupo PCO. **Conclusiones:** El incremento concomitante de la secreción de GH y LH en las adolescentes delgadas con PCO sugiere una alteración neuroendócrina común. El aumento de GH puede amplificar la acción de las gonadotropinas en el compartimiento ovárico.

- 262. Posible autoregulación por encefalina (ENK) de la secreción de catecolaminas (CA) en cultivos primarios de feocromocitomas humanos (CFH).** Eliana Pellizzari, Gloria Levin, María de Lourdes Figuerola, Selva Cigorraga, Marta Barontini.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños "R. Gutiérrez". Buenos Aires. sertoli@cedie.puti.gov.ar

En cultivos de células cromafines se ha observado que las CA se almacenan y liberan con ENK, sugiriéndose que éstas podrían modular alguna de las acciones periféricas de dichas aminas. El objetivo fue analizar en CFH la regulación de la secreción de CA mediada por ENK. Células aisladas provenientes de 6 tumores se cultivaron durante 5 días en DMEM:F12, 5 % SFB y 10% suero de caballo, luego de 48 horas grupos de células se estimularon con ENK (1 μ M); dexametasona (DEXA, 10 μ M) y naloxona (Nalo, 10 μ M). En los medios condicionados por 72 horas (día 2 a 5) se determinaron los niveles de noradrenalina (NA), adrenalina (A) y dihidroxiifenilglicol (DHPG), por HPLC-DE. ENK se determinó por radioinmunoensayo, en condiciones basales y bajo DEXA. La ENK disminuyó la NA en 5/6, A 3/5 y DHPG 4/5 CFH (porcentaje de disminución NA: 24 \pm 4*; A: 24 \pm 10; DHPG: 48 \pm 23; X \pm ESM; *p<0,05, Wilcoxon rank sum test). La DEXA indujo un aumento de ENK en 5/5 (Basal: 0,16 \pm 0,01; DEXA: 0,28 \pm 0,04*, X \pm ESM, *p<0,05) y una disminución de NA en 4/6. La Nalo estimuló la NA en 2/5 y no la modificó en 3/5. Los resultados obtenidos sugieren una posible autoregulación por ENK de la secreción de CA en CFH.

263. Regulación por leptina de la secreción de transferrina en células de Sertoli en cultivo. Eliana Pellizzari, Silvina Meroni, Selva Cigorraga.

*Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez". Buenos Aires.
e-mail: sertoli@cedie.guti.gov.ar.*

Se ha demostrado la presencia de receptores para leptina (Lep) en el tejido gonadal y la capacidad de esta citoquina de regular la esteroidogénesis en células ováricas y células de Leydig. En el presente trabajo se analiza la posible regulación por Lep de la funcionalidad de las células de Sertoli. Se utilizaron cultivos de células de Sertoli de ratas de 20 días de edad y se analizó como parámetro funcional la secreción de transferrina (Trf). Los niveles de Trf se determinaron por radioinmunoensayo en medios condicionados por células estimuladas durante 72hs con Lep (1; 10 y 100ng/ml), en presencia o ausencia de insulina (Ins, 10 μ g/ml) y/o FSH (100ng/ml). Se observó que Lep no modifica la secreción basal de Trf, mientras que produce una inhibición dosis dependiente de su secreción en células estimuladas con Ins (Control 38,8 \pm 0,6; Lep1ng/ml 36,2 \pm 2,1; Lep10ng/ml 30,9 \pm 0,8*; Lep100ng/ml 25,2 \pm 2,2* ng/ugADN; x \pm ESM; *p<0,05); y un estímulo en células tratadas con FSH (Control 40,4 \pm 2,6; Lep1ng/ml 58,6 \pm 1,9*; Lep10ng/ml 65,6 \pm 5,1*; Lep100ng/ml 61,6 \pm 3,6* ng/ugADN; x \pm ESM; *p<0,05). En cultivos estimulados conjuntamente con Ins y FSH, Lep no modificó la secreción de Trf. Los resultados obtenidos demuestran que Lep modula la secreción de Trf estimulada por FSH y por Ins en células de Sertoli.

264. Regulación de la expresión de IL-6 en hipófisis anterior por el polipéptido PACAP, endotoxina y estrógenos. Alberto Carbia Nagashima¹, Carolina Perez Castro¹, Damiana Giacomini¹, Marcelo Paez Pereda², Ulrich Renner², Günter Stalla², Eduardo Arzt¹.

¹Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. FCEN-UBA, CONICET. ²Max Planck Institute, Alemania.
earzt@bg.fcen.uba.ar

La secreción de interleuquina-6 (IL-6) por las células foliculo estrelladas (FS) de la hipófisis anterior es importante para la regulación de la secreción hormonal y proliferación de las células hipofisarias. Estudiamos la regulación de la expresión de IL-6 en la línea FS TtT/GF: secreción por ELISA y a nivel de promotor por transfecciones con construcciones reporter IL6-LUC completo o con mutaciones puntuales en los sitios de respuesta a los factores de transcripción NF-kB (Δ kB-IL6) y AP-1 (Δ AP1-IL6) y con vectores kB-LUC y AP1-LUC. Observamos que la estimulación de IL-6 por PACAP 100 nM es a nivel transcripcional (31%-65%) y es potenciada por endotoxina

(LPS) 100 ng/ml (31%). Los estrógenos (E₂) inhiben (24%-67%) tanto la secreción de IL-6 como la actividad del promotor inducida por PACAP en forma dosis-dependiente (0,1 nM – 1000 nM) mediante un receptor funcional (detectado por RT-PCR y estimulación de ERE-LUC). PACAP estimula la actividad de AP-1 (35%) pero no estimula NF-kB; mientras que LPS estimula predominantemente NF-kB (37%) y E₂ 100 nM inhibe AP-1 (36%). La mutación Δ AP1-IL6 no fue estimulada por PACAP y sí fue estimulada (40%) la construcción con la mutación Δ kB-IL6. La cotransfección de IL6-LUC con un represor de NF-kB (IkB) no afectó la estimulación por PACAP. Estos resultados demuestran que PACAP, a diferencia de LPS que estimula la vía de NF-kB, estimula IL-6 a nivel transcripcional involucrando la vía AP-1, y esta inducción es inhibida por E₂.

265. Mecanismos moleculares involucrados en la inducción de POMC y secreción de ACTH por IL-1: regulación del receptor nuclear Nur77. Damián Kovalovsky, Eduardo Arzt.

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA. CONICET. e-mail: earzt@bg.fcen.uba.ar

Las células hipofisarias constituyen un nexo entre el sistema nervioso central y el sistema inmune. Interleuquina-1 (IL-1) en las células corticotrofas produce un aumento en la secreción de adenocorticotrofina (ACTH) e induce proopiomelanocortina (POMC). Mediante transfecciones de células corticotrofas AtT-20 con vectores NurRE-LUC (que responde a Nur77 y Nurrr1) analizamos la actividad transcripcional de estos factores de transcripción. Mediante Northern-blot analizamos la modulación del RNAm de Nur77 y Nurrr1. Observamos que IL-1(100U/ml) y no IL-6, LIF ni IL-11, estimula al vector NurRE-LUC (100%) y al RNAm de Nur77 (50%) pero no a Nurrr1. Un inhibidor de la proteína quinasa p38, y no un inhibidor de PKC, bloquea este efecto. Observamos que IL-1 sinergiza con el factor liberador de adenocorticotrofina (CRH) en la activación de NurRE-LUC, esto se correlaciona con el sinergismo IL-1/CRH en la secreción de ACTH. Finalmente creamos una línea celular derivada de AtT20 (AtT20N77), que sobreexpresa un dominante negativo de Nur77. Esta línea celular responde normalmente a la estimulación de NFkB por IL-1, sin embargo la estimulación del RNAm de POMC se ve afectada. Estos resultados confirman la dependencia de Nur77 y no Nurrr1 en la inducción de POMC por IL-1.

266. Coactivadores del receptor de glucocorticoides son utilizados por NFkB. Ignacio Nojek, Santiago Werbahj, Mónica Costas.

*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires.
Mail: inojek@bg.fcen.uba.ar*

La inmunosupresión ejercida por glucocorticoides se debe a una interacción física entre el receptor de glucocorticoides (GR), con el factor nuclear kB (NFkB) activado por citoquinas, así como la inducción del factor inhibitorio de NFkB (IkB). La transactivación del GR está modulada por numerosos coactivadores. Con el objetivo de determinar si estas moléculas podían interactuar con NFkB, células HeLa fueron transfectadas con vectores de expresión de los coactivadores: TIF-2, SRA y RAC-3 (sobreexpresado en tumores), se analizó a) la actividad transcripcional de NFkB activado por TNF- α (10 ng/ml), b) la interacción física de RAC-3 con Rel-A (un componente de NFkB) por coimmunoprecipitación y western blot, c) la posible reversión del antagonismo entre GR y NFkB en su actividad transcripcional sobre genes reporteros por transfección con dosis crecientes de los vectores de coactivador y estimulación con TNF- α y dexametasona. Se observó: a) Todos los coactivadores aumentaron la transactivación por NFkB en forma dosis-dependiente (hasta 24 veces para RAC-3), b) RAC-3 interacciona físicamente con NFkB, c) Se observó una clara reversión en forma dosis de coactivador-dependiente (ej:

con 2 µg de vector RAC-3, dexametasona 50 nM y TNF-α 10 ng/ml, la actividad GRE-LUC aumentó 10 veces respecto del valor obtenido sin RAC-3). Estos resultados demuestran que NFκB utiliza coactivadores de GR y la competencia por los mismos podría constituir un mecanismo adicional de antagonismo entre citoquinas y glucocorticoides.

ONCOLOGIA IV

- 267. Homocigocidad para una mutación en el gen BRCA-2: manifestación clínica de un probable fenómeno de epistasis.** Ricardo Dourisboure¹, María Viniestra¹, Reinaldo Chacón¹, Ernesto Podestá² y Angela Solano^{1,2}.

Instituto A. Fleming¹ y Lab. HRDC, Dto de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA².

El portador heterocigota de mutaciones en los genes BRCA1-2 tiene alto riesgo a cáncer de mama (CaM). Animales experimentales homocigotas al gen mutado resultaron inviables. Estudiamos 22 individuos con historia familiar de cáncer de mama para su asesoramiento genético-clínico. En una familia con mutación BRCA-2del6174 y antecedentes de CaM por rama paterna y materna, una mujer sana de 52 años es homocigota a la mutación. Este hallazgo es descripto por primera vez. Los resultados se corroboraron por secuenciación de ambas cadenas. La hermana de 58 años sana, es portadora de la mutación. En el rango de 50 a 60 años el riesgo de cáncer de mama de las portadoras heterocigotas se estima del 60%. El estudio del haplotipo no reveló características distintivas, aunque debe resaltarse que las correlaciones fenotipo-haplotipo en estos estudios hereditarios están apenas en el inicio. Concluimos que aunque los resultados experimentales harían presumir que la posibilidad de homocigocidad es nula, nuestro hallazgo demuestra que en el humano puede estar presente y ni siquiera hace presumir un mayor riesgo, considerando la edad de ambas mujeres. Otros genes en una posible interacción epistática con el gen BRCA2 en la forma homocigota podría ser una de las causas de la ausencia de enfermedad.

- 268. Evolución cariotípica de sublíneas de una línea celular de carcinoma mamario murino.** Victoria Fabris, Caroline Lamb, Susana Merani, Claudia Lanari.

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). (e-mail: molinolo@dna.uba.ar)

De una línea celular derivada de un carcinoma mamario murino hormono-dependiente de morfología epitelioide, surgieron espontáneamente hacia el repique 16 una población de morfología epitelial típica (EP) y otra fibroblastoide (FB). Se realizaron estudios citogenéticos analizando las metafases por bandejo G y evaluando el número modal (100 metafases). Se clonó por dilución límite la población EP que mostró un cariotipo diploide (ratón normal 2n=40). Estas células fueron progresivamente reemplazadas por una población triploide (2n=65) que apareció después de 9 repiques. En todos los pasajes estudiados se observaron cuatro cromosomas marcadores, también presentes en el tumor parental. En la línea FB no se lograron separar completamente las células fibroblastoides de las células epiteliales y se enriqueció por despegado diferencial. Esta sublínea mostró un cariotipo hipotetraploide (2n=68) desde repiques tempranos, con uno sólo de los marcadores encontrados en las células EP. En el repique 60 se observó un cambio en la morfología de las células FB, que se hicieron menos ahusadas, coincidente con la disminución de las células epiteliales y la aparición de una población con más de 90 cromosomas, que mantenía el cromosoma marcador. Se puede concluir que existe una tendencia a la poliploidía favorecida por el cultivo *in vitro*. En este modelo los cambios morfológicos estuvieron siempre asociados a cambios citogenéticos.

- 269. Modulación por TGF-B del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y su inhibidor PAI en tumores mamarios murinos con diferente capacidad metastásica.** Cecilia Daroqui, Alejandro Urtreger, Lydia Puricelli, Elisa Bal de Kier Joffé.

Area Investigación, Instituto de Oncología «Angel H. Roffo». Universidad de Buenos Aires.

e-mail: cdaroqui@fmed.uba.ar

Se conoce que los TGF-B son altamente pleiotrópicos e intervienen en el desarrollo neoplásico. Estudiamos la capacidad de TGF-B de modular el sistema de proteólisis uPA/PAI, en cultivos primarios de M3 y MM3 y en la línea derivada LMM3. Los cultivos se trataron con TGF-B1, 2 ó 3 (4-40 ng/ml). A las 24 hs se evaluó el uPA secretado o asociado a células, mediante caseinólisis radial (actividad) o Western blot. Las células MM3, más metastásicas, respondieron a las 3 isoformas del factor con un aumento de uPA, tanto secretado como asociado a membrana (p.ej. TGF-B1 4 ng/ml=1,74±0,4 vs células sin tratar=0,03 UI/mg prot., p<0,01). No se detectó PAI (zimografía reversa) en presencia o no de TGF-B. En cambio, en las células menos metastásicas M3, TGF-B inhibió significativamente la actividad de uPA secretado, paralelamente con un aumento de hasta 5 veces en la actividad de su inhibidor PAI. Por otra parte, en la línea celular LMM3, de fenotipo muy metastásico, el tratamiento con TGF-B también indujo un incremento dosis-dependiente en la actividad de uPA secretada (p.ej. TGF-B2 40 ng/ml=19±3 vs control=9,8±1 UI/mg prot., p<0,01), si bien también aumenta PAI. Nuestros resultados muestran una modulación independiente de uPA y PAI por TGF-B. Además los TGF-B sólo estimularon la actividad proteolítica neta en las células más metastásicas, sugiriendo su participación en la promoción de la progresión tumoral.

- 270. Dosaje de la actividad plasmática de MMP-9 en pacientes con tumores de cabeza y cuello.** Stella Maris Ranuncolo, Marta Vilensky, Dora Loria, Elena Matos, Elisa D. Bal de Kier Joffé, Lydia Puricelli.

Area Investigación.- Instituto de Oncología «Angel H. Roffo».- UBA. invroffo@fmed.uba.ar

La actividad de metaloproteasas (MMPs) se asocia a las distintas etapas de la progresión tumoral. Previamente demostramos que la actividad MMP-9 circulante se encuentra significativamente elevada en pacientes con cáncer de mama respecto de pacientes con patologías tumorales benignas y de controles sanos. Objetivos: determinar si la actividad MMP-9 circulante se encuentra aumentada en pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello y analizar su posible rol como marcador tumoral de diagnóstico. Se estudió la actividad MMP-9 en la fracción euglobulina plasmática de 92 pacientes con tumores de cabeza y cuello [(Ca.epidermoide infiltrante de distintos grados de diferenciación, 41 (cavidad oral) y 51 (laringe)] y de 50 controles sanos, empleando zimografía cuantitativa. En los pacientes portadores de patología tumoral la actividad MMP-9 se halla significativamente incrementada [Md 2.08 y rango (0.01-6.37)] respecto del grupo de individuos sanos [0.48 (0.00-1.80)]. El análisis multivariado mostró que los niveles MMP-9 plasmáticos no se asocian con edad, sexo o topografía ni con los indicadores de pronóstico conocidos como estadio o diseminación metastásico. El hallazgo de actividad MMP-9 plasmática elevada en pacientes con neoplasias de cabeza y cuello, sugiere su potencial aplicación en el seguimiento de pacientes portadores de esta patología.

- 271. Oxidnitrógeno sintasas en cánceres urológicos.** Ana M. Eiján, María D. Riveros, Eduardo O. Sandes, Soledad Galli, Francisco Celeste, Eugenia S. de Lustig, Alberto R. Casabé.

Departamentos de Inmunobiología, Urología y Anatomía Patológica. Inst. A. H. Roffo. Av. San Martín 5481, 1417 Bs As. Argentina. e-mail: amerueda@ciudad.com.ar

El óxido nítrico (NO) es generado en células de mamíferos por la conversión de L-arginina a citrulina. La reacción es catalizada por tres isoformas de NO sintasas, neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). En cánceres de mama y ginecológicos se ha correlacionado la expresión de NOS con el grado de malignidad de los tumores. Por el contrario en cáncer de colon la expresión de NOS está disminuida con respecto a la mucosa colónica normal. Anteriormente demostramos que el NO está aumentado en la orina de pacientes con cáncer de vejiga. En este trabajo estudiamos la expresión de nNOS e iNOS por western blot, con anticuerpos específico. Procesamos biopsia tumorales de 17 pacientes, 13 con tumor de vejiga (10 carcinomas transicional (TCC), 1 in situ y 2 adenocarcinomas), 3 tumores de riñón (1 TCC y 2 renales) y 1 TCC de vías escretoras. En nueve casos fue posible obtener también tejido normal peritumoral. Los resultados expresados como mediana: rango en densidad óptica / mm²/mg proteína, indican que la nNOS se expresa en el 100% de los tejidos normales (28:3-67, n=9) y en el 88% de los tumores (6:0-44, n=17). Por el contrario la iNOS fue detectada en el 66% de los tumores (2:0-7, n=15) y sólo en el 38% de las muestras normales (0:0-4, n=8). Nuestros resultados indican que la nNOS está disminuida (p=0.05) y la iNOS está aumentada (p=0.02) en tejido tumoral comparado con el normal peritumoral. Será necesario evaluar mayor número de casos para establecer su relación con parámetros histopatológicos.

272. Receptores Alfa2-adrenérgicos (RA2) en líneas celulares mamarias humanas (tumores y no tumorales). Stella Vázquez, Alejandro Mladovan, Alberto Baldi, Isabel Lüthy.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires. e-mail: iluthy@dna.uba.ar

Habíamos descrito la expresión de los subtipos C2 y C4 de RA2 en tres líneas tumorales mamarias humanas y la misma estaba asociada a un aumento en la incorporación de timidina tritiada. El objetivo de este trabajo fue investigar si en otras líneas celulares tumorales y no tumorales de mama humana se expresaban estos mismos subtipo de receptor. Para ello se analizó la expresión por RT-PCR, la unión de [³H]-Rauwolfscina tritiada ([³H]-RW) y la incubación de las células con agonistas y antagonistas adrenérgicos. Las células no tumorales HBL-100 y MCF-10A expresaron RA2 C2 y C4. La línea tumoral MDA-MB-231, una débil banda de C2 y la HS-578, C10. Las células MCF-10A unieron [³H]RW: 22.5 ± 10,1 y las MDA-MB-231: 17,5 ± 5,11 fmol/ 10⁶células. La incorporación de timidina tritiada con el agonista específico clonidina se incrementó significativamente tanto en la línea HBL-100 (Clo 10 pM: 3876 ± 325 vs C: 1876 ± 61 cpm, p<0,001) como en MDA-MB-231 (Clo 10 pM: 3030 ± 102.52 vs C: 2401 ± 130 cpm, p<0,01). La incubación de HS-578 con el agonista específico C10 oximetazolina también provocó un aumento de la proliferación (1485 ± 73,8 vs 1134 ± 31,8 cpm, p<0,001). Todos fueron revertidos por antagonistas. Todas las líneas analizadas expresaron por lo menos un subtipo de receptor alfa2 adrenérgico y su estimulación provocó un aumento de la proliferación celular.

273. Efecto comparativo de tres antiestrógenos (AE): ICI 182780 (ICI), tamoxifeno (TAM) y raloxifeno (RAL) sobre el crecimiento de un adenocarcinoma mamario murino progéstágeno dependiente (PD). Caroline Lamb, Luisa Helguero, Alfredo Molinolo, Claudia Lanari.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). molinolo@dna.uba.ar

En carcinomas mamarios murinos que expresan receptores de estrógeno y progesterona (RP) demostramos que el acetato de medroxiprogesterona (MPA) estimula la proliferación celular (PC) y el E₂ es inhibitorio. Se utilizó un AE puro (ICI) y dos AE esteroideos del tipo SERM (moduladores selectivos del receptor

de estrógeno), TAM y RAL. El objetivo fue evaluar el efecto de distintos AE sobre la PC inducida por MPA y sobre la expresión de RP en cultivos primarios de un tumor PD. En cultivos primarios de una línea tumoral PD (C4-HD), en presencia de MPA 10⁻⁸M, tanto el E₂, como el ICI (p<0.001) y el TAM (p<0.05) inhibieron la PC a partir de 10⁻⁸M; RAL aumentó la estimulación inducida por MPA en concentraciones de 10⁻⁸M (MPA: 6136±684 cpm vs. MPA + RAL 10⁻⁸M: 11000±1064 cpm, p<0.001). En ensayos de unión al ligando del RP, tanto el E₂ (Ej. 112%, p<0.001) como el TAM (Ej. 31%, p<0.001), pero no RAL, aumentaron la síntesis de RP; el ICI la disminuyó (Ej. 69%, p<0.001). Estos resultados sugieren que el TAM actúa como agonista estrogénico tanto en la inhibición de la PC como en la síntesis de RP mientras que el RAL actúa como antagonista. El ICI, al inhibir RP, inhibiría la PC por un mecanismo diferente. Nuestros datos indicarían que los dos AE tipo SERM, de reportada actividad similar en glándula mamaria, actuarían en forma diferente en este modelo.

274. Cambios en los receptores a histamina durante la progresión maligna: un modelo de melanoma. Eszter Lázár, Gabriela Martín*, Hargita Hegyesi, Graciela Cricco*, Susza Darvas, Carlos Fitzsimons*, Rosa Bergoc*, Andrés Falus, Elena Rivera*.

**Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Semmelweis University of Medicine, Budapest, Hungría. erivera@ffyb.uba.ar*

La histamina (Hi) actúa en diversos procesos fisiológicos y patológicos y la mayor parte de los efectos mitogénicos involucran a los receptores H₂ (RH₂). En este trabajo investigamos en 4 líneas de melanoma WM35, WM983, HT168 y M1/15, (en orden creciente de capacidad metastásica) el papel de los RH₂ y RH₁ en la proliferación celular mediada por Hi. Los RH₁ y RH₂ se estudiaron mediante ensayos de unión con radioligandos y los niveles de expresión de ARNm por RT-PCR. La proliferación se evaluó mediante la formación de colonias empleando Hi, agonistas y antagonistas específicos y análogos de AMPc. El contenido de Hi se cuantificó por RIA. Los RH₁ están presentes las 4 líneas (Kd=35±10 nM), las más metastásicas (HT168, M1/15) expresan mayor nivel de ARNm y n° de sitios. La Hi a altas dosis (10 uM) a través de RH₁ produce una significativa inhibición de la proliferación (44% vs controles, p<0.01). Los RH₂ (Kd=22±8nM) están sobreexpresados en la línea WM35 y en las restantes su número y nivel de ARNm disminuye siendo no detectables en la M1/15. La Hi a bajas dosis (100 nM) y agonistas H₂ estimulan la proliferación celular en las WM35 (140% vs controles, p<0.05) a través de la producción de AMPc. En las otras líneas los RH₂ cambian su asociación a los 2° mensajeros perdiendo la capacidad de estimular la proliferación. Las 4 líneas tienen un elevado contenido endógeno (7-16 pmol/10⁶cel) y liberan Hi al medio extracelular (0.7-1.7 nM). Estos datos indican un papel fundamental de los RH₂ en la regulación autocrina mediada por Hi.

INMUNOLOGIA IV

275. Producción de óxido nítrico (NO) por células leucémicas purificadas provenientes de pacientes con LLC-B (leucemia linfática crónica B). Silvia Kohan, Lilia Davel, M. Adela Jasnís, Ana Eiján, Eugenia S. de Lustig y Fernando Bezares.

Instituto de Oncología A.H.Roffo y Policlínica Bancaria, Buenos Aires, Argentina. (inmuroff@fmed.uba.ar)

Células mononucleares periféricas totales (PMC-T) de pacientes con LLC-B progresiva (P) producen en cultivo mayor cantidad de NO que las provenientes de pacientes con enfermedad estable (E). **Objetivo:** determinar si las células productoras de NO son las células leucémicas (CL) o las células ac-

cesorias (LT, NK, monocitos). **Materiales y métodos:** se purificaron CL (95%) a partir de PMC-T, utilizando Dynabeads Pan Mouse IgG y anticuerpos monoclonales antiCD3, antiCD16, antiCD56 y antiCD14. Se cultivaron PMC-T y CL de cada paciente en medio de cultivo por 20 hs y se determinó la concentración de NO_2^- como medida de la producción de NO por reactivo de Griess. **Resultados:** se expresan como $\mu\text{M NO}_2^-$, mediana (rango). La producción de NO_2^- por CL de pacientes (P) fue significativamente mayor que en pacientes (E): 2,7 (1,1-3,3) vs 1,2 (0-1,90); Mann Whitney test $p < 0.05$. No hubo diferencias significativas en la producción de NO_2^- entre PMC-T y CL de pacientes P: 2,6 (1,9-5,4) vs 2,7 (1,1-3,3) respectivamente, como de pacientes E: 0,9 (0-2,2) vs 1,2 (0-1,9) respectivamente. **Conclusión:** a) las células leucémicas (CL) son la fuente principal de producción de NO del total de PMC de pacientes con LLC-B ya sea P o E; b) la producción de NO por células leucémicas purificadas es mayor en pacientes P que en E. El aumento de NO producido por las CL estaría asociado a la progresión de la LLC-B.

276. CD1d: potencial molécula inmunoreguladora T. María del C. Salamone, G. A. Rabinovich, Ana K Mendiguren, Gabriela V. Salamone y L. Fainboim.

División Inmunogenética. Htal. de Clínicas. José de S. Martín. Fac. de Medicina. UBA.

El antígeno CD1d humano se expresa en células del epitelio intestinal, timocitos y hepatocitos. En el presente trabajo nosotros demostramos que la expresión de este antígeno es significativamente incrementada en linfocitos T (LT) maduros activados. La presencia de esta molécula fue confirmada por técnicas de citometría de flujo, RT-PCR, Western blot (WB) e inmunohistoquímica (Ih). CD1d fue identificado sobre células mononucleares periféricas (CMP) estimuladas con PHA y aloantígenos por diferentes períodos de tiempo, utilizando el AcMo NOR3.2. Estudios de citometría de flujo, revelaron un claro incremento de la intensidad media de fluorescencia (IMF) sobre CMP activadas. Una banda de 49Kd compatible con la molécula descrita en timocitos, fue identificada por WB. Estudios de cinéticas de expresión mostraron que los niveles de proteínas expresados son mayores en tiempos tempranos de activación precediendo al pico de máxima proliferación. Los máximos niveles fueron detectados luego de 48 h para células estimuladas con PHA y luego de 72h para LT estimulados por aloantígenos. El patrón de marcación detectado por Ih, mostró una localización subcelular de este antígeno en la membrana plasmática, acompañada por una distribución citoplasmática y perinuclear, compatible con una acumulación de esta glicoproteína en el RER. Nuestros resultados demuestran claramente la expresión de CD1d en LT activados, lo que reviste un significativo hallazgo biológico, si se considera que una subpoblación de las células NKT se encuentran reguladas por el reconocimiento de CD1d.

277. Reciclaje del antígeno CD1a en células mononucleares periféricas activadas (CMP). Ana K Mendiguren, María M. Cortés, M. Barboza, L. Fainboim y María del C. Salamone.

División Inmunogenética. Htal. de Clínicas José de San Martín. Fac. de Medicina. UBA.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que el antígeno CD1c recicla rápidamente sobre la superficie celular de linfocitos T (LT) maduros activados. En este trabajo nosotros evaluamos la capacidad de reciclaje del antígeno CD1a en CMP activados. Inmunomarcaciones (IM) realizados sobre células estimuladas con PHA, a 4° C y a 37° C, utilizando el AcMo NA1/34 (anti-CD1a), han revelado en todos los casos resultados negativos. Por el contrario, un desplazamiento de la intensidad media de fluorescencia (IMF) fue observado en IM realizadas entre 18-22°C, sugiriendo un rápido reciclaje de esta molécula desde la membrana plasmática hacia depó-

sitos intracelulares. Diferentes inhibidores tales como brefeldina A (BFA), cloroquina y citocalasina B (CB) fueron utilizados para evaluar la vía de exocitosis/endocitosis utilizada por este antígeno. CMP activadas por 48 h con PHA, fueron incubadas durante 1h a 37°C con cada inhibidor, posteriormente el AcMo NA1/34 fue agregado durante 1h adicional. Luego de fijar y permeabilizar, las células fueron marcadas con un Ac GAM FITC. Los resultados obtenidos revelaron un claro incremento en la IMF cuando las células fueron previamente tratadas con BFA. CD1a carece en su fracción citoplasmática de motivos YXXZ (Y: residuo de tirosina, X: cualquier aa, Z: aa hidrofóbico), secuencia responsable del tráfico intracelular de CD1b, CD1c y CD1d. Sin embargo nuestros resultados demuestran que este antígeno es rápidamente endocitado desde la membrana plasmática de LT activados a través de un camino atípico que es incrementado en presencia de BFA.

278. Los complejos inmunes (CI) inhiben la expresión basal e inducida por IFN-g de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en monocitos humanos. Paula Barrionuevo, Macarena Beigier Bompadre, Silvia de la Barrera, Gabriela Fernández, Marina Palermo, Martín Isturiz.

División Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. isturiz@mail.retina.ar

Las MHC-II son esenciales en la presentación antigénica. Anteriormente fue demostrado que los CI inhiben la transcripción de las MHC-II inducida por IFN-g en macrófagos murinos. En este trabajo investigamos el efecto de los CI ovaalbúmina (OA)-IgG anti-OA en la expresión de las MHC-II en células mononucleares humanas. La expresión de las MHC-II fue evaluada por citometría de flujo y los monocitos fueron identificados como CD14⁺. Los resultados obtenidos demuestran que los CI inducen una drástica inhibición de la sobreexpresión de las MHC-II lograda luego de 24 hs de incubación con IFN-g (240 U/ml). Los CI también inhibieron la expresión basal de las MHC-II. Los resultados son expresados como % de MIF del control \pm SEM: a) CI:58 \pm 7; b) IFN-g:304 \pm 45; c) CI+IFN-g:71 \pm 10; n=17; a) vs control $p < 0,01$; b) vs c) $p < 0,01$. Esta inhibición de la expresión de las MHC-II correlacionó directamente con la presentación antigénica, medida en un ensayo de proliferación. Los resultados, expresados como índice de incorporación de ³H-timidina, fueron los siguientes: a) control:2,46; b) CI:1,35; c) IFN-g:5,27; d) CI+IFN-g:2,33; n=5; a) vs b) $p < 0,01$; c) vs d) $p < 0,01$. Los sobrenadantes (SN) de células mononucleares tratadas con CI inhibieron la expresión inducida por IFN-g. a) IFN-g:245 \pm 31; b) IFN-g+SN:131 \pm 18; n=5; a) vs b) $p < 0,05$. La inhibición del efecto de los SN por pepstatin y fosforamidón sugiere que la secreción de peptidas aspárticas y metaloproteasas constituye un mecanismo adicional en la regulación de las MHC-II por parte de los CI en un proceso inflamatorio.

279. El N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) inhibe la expresión del FcγRI inducida por IL-10 en monocitos humanos. Macarena Beigier Bompadre, Paula Barrionuevo, Fernanda Alves Rosa, Carolina Rubel, Marina Palermo, Martín Isturiz.

División Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. isturiz@mail.retina.ar

Los receptores para la porción Fc de IgG (FcγRs) cumplen un rol importante en la respuesta inflamatoria. El FcγRI es capaz de mediar la fagocitosis y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Tanto el IFN-g como la IL-10 inducen un aumento en la expresión del FcγRI en monocitos. En trabajos anteriores demostramos que el FMLP inhibe el aumento en la expresión del FcγRI producida por IFN-g en monocitos humanos. En este trabajo investigamos el efecto

del FMLP en la inducción del FcgRI por IL-10 utilizando células mononucleares humanas. Cuando las células fueron incubadas con FMLP ($1 \times 10^{-6} M$) durante 1h, lavadas y luego se les agregó IL-10, el FMLP ejerció una drástica inhibición del aumento del FcgRI inducido por la incubación con IL-10 ($100 U/ml$) durante 24 hs. La expresión del FcgRI fue evaluada por citometría de flujo y los monocitos fueron identificados como la población CD14⁺. Los resultados se expresan como % de MIF del control \pm SEM: a) FMLP: 107 ± 15 ; b) IL-10: 190 ± 17 ; c) FMLP+IL-10: 142 ± 9 ; n=9; b) vs c) $p < 0.05$. Esta inhibición del aumento en la expresión del FcgRI se correlacionó con una inhibición del aumento en la ADCC. El ensayo de ADCC se realizó con monocitos adheridos en placas. Los resultados se expresan % del control \pm SD en un experimento representativo: a) FMLP: 89 ± 18 ; b) IL-10: 261 ± 60 ; c) FMLP+IL-10: 86 ± 34 ; n=6; b) vs c) $p < 0.05$. Conclusión: los péptidos formilados pueden tener funciones regulatorias en inflamaciones por infecciones bacterianas.

280. Participación de MAPquinas en la activación de neutrófilos periféricos humanos (PMN) inducida por el fibrinógeno (Fbg). Carolina Rubel, Gabriela Fernández, Macarena Beigier Bompadre, Graciela Dran, Martín Isturiz, Marina Palermo.

División Inmunología, ILEX, IIHEMA. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina

Previamente demostramos que el Fbg activa a los PMN, por interacción con la β_2 integrina CD11b/CD18. Dicha activación se manifiesta en aumento de la expresión del CD11b, degranulación e inhibición de la apoptosis. Simultáneamente, el Fbg induce la rápida fosforilación en tirosina de dos proteínas de aprox. 125 y 40 Kd. Siendo la fosforilación de proteínas un evento importante en la transducción de señales, investigamos qué proteína-kinasa estaba involucrada en la activación de PMN por Fbg. Utilizamos inhibidores de las MAPquinas *p38* (**SB203580**) y *Erk* (**PD98059**), ya que ambas presentan un PM aproximado a 40 Kd. Se observó que el inhibidor de *Erk* bloqueó la degranulación inducida por Fbg (media de fluorescencia del CD66: *Control*: 82 ± 7 ; *+Fbg*: 205 ± 28 ; *+PD98059+Fbg*: 71 ± 4). El inhibidor de MAPkinasa *p38* no tuvo efecto (*+SB203580+Fbg*: 175 ± 18). Resultados similares se observaron al medir el % de apoptosis a 18 hs (*Control*: 63 ± 6 ; *+Fbg*: 31 ± 5 ; *+PD98059+Fbg*: 60 ± 15 ; *+SB203580+Fbg*: 32 ± 12). Estudios realizados con inhibidores del *NFkB*, revelaron que dicho factor de transcripción no interviene en la activación por el Fbg. Ninguno de los inhibidores evaluados inhibe la sobreexpresión del CD11b. Estos resultados sugieren que la degranulación y la inhibición de la apoptosis inducidas por Fbg estarían mediadas por la MAPkinasa *Erk*. Sin embargo, los resultados obtenidos no nos permiten descartar la colaboración entre distintas familias de kinasas en el efecto final del Fbg.

281. Inducción de apoptosis y regulación de la producción de citoquinas por flavonoides en una leucemia murina. Paula V. Cerdá Zolezzi; Paula C. Alicino; Marcelo L. Wagner; Rafael A. Ricco; Teresa Fernández; Silvia Hajos; Éilda Álvarez.

Cátedra de Inmunología- Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral y Cátedra de Farmacobotánica., Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. e-mail: elialv@ffyb.uba.ar Fax: 54-011-4964-0024.

En nuestro laboratorio se vienen estudiando los efectos anticancerígenos del muérdago argentino, *Ligaria cuneifolia*. Se demostró que distintas fracciones de flavonoides aisladas del mismo inhiben el crecimiento de células de la leucemia murina LB, siendo la fracción extraída con acetato de etilo la que posee el mayor efecto. El objetivo del presente estudio es ahondar en los mecanismos responsables de los efectos observados. Se obtuvieron las fracciones de flavonoides

metanólica (M), acetato de etilo (AE) y agua (H). Estas fueron adicionadas a los cultivos de células LB, en concentraciones de 10 a 200 $\mu g/ml$ para el ensayo de apoptosis y de 50 $\mu g/ml$ para la RT-PCR. El nivel de apoptosis fue determinado por coloración con Bromuro de Etidio/ Naranja de Acridina y análisis de la fragmentación del ADN en geles de agarosa. Para la PCR se usaron primers específicos para IL-2, IL-10 y TGF- β . **Resultados:** La fracción AE produjo un aumento significativo de la apoptosis neta en 200 $\mu g/ml$, tanto a las 24 como a las 48 hs (41 ± 6 y 54 ± 13 respectivamente), mientras que en 100 $\mu g/ml$ el efecto fue solo evidenciado a las 48 hs (46 ± 16). La fracción H mostró un leve incremento en 200 $\mu g/ml$ a las 48 hs (29 ± 3). La fracción M no tuvo efecto sobre la apoptosis basal en ninguna de las dosis ensayadas. La expresión de citoquinas, (referido a b-actina), reveló que la fracción AE fue activa con una reducción del 77% para IL-2 y del 66% para IL-10. La fracción M produjo una reducción del 52% para IL-10; no se evidenciaron diferencias significativas para IL-2 y TGF- β . **Conclusiones:** 1) La inhibición del crecimiento celular está mediada por la inducción de apoptosis. 2) La fracción AE presenta el componente activo, inductor de la muerte celular. 3) La fracción AE es capaz de modificar el patrón de secreción de citoquinas por parte de la célula tumoral, disminuyendo la producción de IL-2 (factor de crecimiento autócrino) así como también de citoquinas probables moduladores negativos de la respuesta inmune anti-tumoral (IL-10).

282. La Ciclofosfamida, en dosis baja, modula la expresión de Galectina-1 y de Bcl-2 en animales portadores de un linfoma. Gabriel Rabinovich¹ y Natalia Rubinstein¹ (ex aequo), Pablo Matar², Viviana Rozados², Silvia Gervasoni², O Graciela Scharovsky².

¹Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas. Universidad de Buenos Aires. ²Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.

En trabajos anteriores demostramos el efecto inmunomodulador antimetastático de una dosis baja y única de ciclofosfamida (Cy) en ratas portadoras de un linfoma B (L-TACB). La galectina-1 (Gal-1) es un miembro de la familia de las galectinas con afinidad por los β -galactósidos que interacciona con la matriz extracelular e interviene en la regulación de la apoptosis en linfocitos T. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de Gal-1 en la inmunomodulación inducida por Cy. Se inocularon ratas e con el linfoma L-TACB, vía s.c., y a los 14 días la mitad de los animales recibieron una inyección i.p. de Cy (10 mg/kg); 7 días después los animales fueron sacrificados y se les extirpó tumor y bazo. Se prepararon suspensiones celulares en las cuales se determinó la expresión de Gal-1 y Bcl-2 por Western blot y se realizaron estudios de fragmentación del ADN genómico. Se obtuvo una alta expresión de Gal-1 en los tumores de ratas no tratadas y un descenso del 49% en animales tratados con Cy ($p=0,0190$). Se observó baja expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en los tumores de ratas tratadas con Cy (43% menos respecto a animales no tratados, $p=0.0169$) y un nivel elevado de la misma en los bazos de animales tratados ($p < 0.001$ respecto a animales no tratados). La expresión esplénica de Bcl-2 se correlacionó inversamente con los resultados de fragmentación del ADN. Los resultados sugieren que las dosis bajas de Cy modulan la expresión de Gal-1 tumoral y disminuyen la apoptosis de las células esplénicas; esto podría explicar, en parte, el aumento de la respuesta inmune antimetastática.

SISTEMA CARDIOVASCULAR IV

283. Hipertension arterial gestacional (HAG). Estudio retrospectivo. Marta Bravo Luna, Beatriz Pérez, Iván Tunkiewicz; Adriana Bollini, Gladis Hernández, Marta Rasia.

*Cát. Biofísica, Cát. Epidemiol. Medicina Preventiva
Facultad de Ciencias Médicas, CIUNR. Rosario,
(mbravoluna@lycos.com)*

ACOG propone 4 categorías para hipertensión arterial en embarazo. Este estudio retrospectivo consideró pre-eclampsia (PE) y 4ta. Categ. (HAG). Puntos de corte (PC) inferiores a ACOG. Se usó criterio de diferencial de presión sistólica (difPAS); PA diastólica (difPAD). Datos: 1310 partos (Maternidad Pública, Nov.1998-Nov.1999). Prevalencia PE y HAG. Análisis asociaciones con gesta (G) y paridad (P), para PA de 1ra. y última consulta (previa parto). PC (mmHg) PAS=>130, PAD=>80. DifPAS=>25; difPAD=>15, para evaluación de asociación con edad, G, P, diabetes (personal/ familiar), hipertensión familiar. Chi cuadrado, cálculo OR crudo (variables dicotomizadas) seleccionándose para regresión logística; cálculo OR ajustados (IC 95% p<0,05). Prevalencia PE: 4%; HAG:2%. PE: asociación (Chi) con: 1) G (5,2); 2) difPAS=>25 (11,1); difPAD=>15 (14,3). Dif. PAD asoc. Con: 1) G (4,0); edad (15,2). HAG: asoc. Con: 1) edad (11,4); 2) P (6,6). Regres. log. Pe: G 1ra+3ra. vs 2da. (OR.ajst; IC95%): 3,7; 1,2-12,1. Dif.PAS=>25: 1,8; 0,99-3,4. Dif.PAD=>15: 2,1; 1,1-3,8. Bondad de ajuste (Hosmer-Lemeshow) p=0,76. Igual estudio N.S. en HAG. Conclusiones: 1) Prevalencia > de PE que HAG. 2) > riesgo PE en 1er. G, y en 3 o más explicable por mecanismo de impronta genómica. 3) PC inferiores en el diagnóstico serían de mayor utilidad en las alteraciones de PA en el embarazo.

284. Hiperinsulinemia y pared arteriolar en ratas Obesas (Zucker fa/fa.) Jorge Toblli, Graciela De Rosa, Gabriel Cao, Pablo Piorno Patricia Pagano.

Laboratorio de Medicina Experimental Hospital Alemán & Departamento de Patología Hospital de Clínicas.

La presencia de hiperinsulinemia en diabetes tipo II (DMII) y obesidad es un hecho conocido, así como el riesgo de enfermedad vascular. Nuestro objetivo fue evaluar la relación entre el estado hiperinsulinémico y estructura vascular en ratas obesas Zucker (ZRF) y controles no obesos Zucker (ZRL). Ratas machos (de 6 semanas), G1= ZRF y G2= ZRL. Luego de 10 meses se evaluó: a)Glucemia (Glu), b)Colesterolemia (Col), c)Trigliceridemia (TG), d) Insulinemia (Ins). En tejido renal con retículo-ocular (de 1cm, dividido en 100 segmentos de 2u c/u a 400x) se evaluó: Pared arteriolar (PAR). Se aplicó test de Mann-Whitney con alfa = 0.05, y regresión múltiple (RM) en el G1 (variable dependiente PAR. e independientes: a)Glu; b)Ins; c) Col; d)TG.

Media ± DS	G1 ZRF (n=12)	G2 ZRL (n=12)	p
Peso Corporal (g)	658.7 ± 101.4	355.5 ± 34.1	<0.01
Glucemia (mg/dl)	251.1 ± 31.4	117.4 ± 11.2	<0.01
Insulinemia (uU/ml)	42.4 ± 28.5	10.3 ± 7.5	<0.01
Colesterolemia (mg/dl)	175.5 ± 62.6	65.5 ± 17.1	<0.01
Trigliceridemia (mg/dl)	611.8 ± 237.4	26.4 ± 5.3	<0.01
Pared Arterial (u)	9.3 ± 0.7	7.6 ± 0.9	<0.01
Relación Pared/luz	1.02 ± 0.08	0.76 ± 0.15	<0.01

La RM demostró que la Ins fue la variable más significativa en la variación de la PAR. (p<0.001; r= 0.819) en ZRF. Estos resultados sugieren un estrecho vínculo entre el estado hiperinsulinémico y el desarrollo del remodelado vascular en la obesidad y DMII.

285. Evaluación Ecocardiográfica en ratas Obesas (Zucker fa/fa.) Carlos Rivas; Ana Uceda; Julieta Bolado; Jorge Toblli.

Laboratorio de Medicina Experimental Hospital Alemán.

La obesidad se asocia a mayor morbimortalidad cardiovascular. Por su parte, la aparición de hipertrofia ventricular izquierda es una variable de mal pronóstico en varias enfer-

medades. Nuestro objetivo fue valorar mediante ecocardiografía la masa ventricular (MV) y fracción de acortamiento (FA) en ratas obesas Zucker (ZRF) y controles no obesos Zucker (ZRL). Se utilizaron ratas machos, G1= ZRF y G2= ZRL, de 10 semanas. Se efectuó ecocardiografía bidimensional con equipo ATL HDI 3000 y transductor de 10 mHz. Se evaluó: a)diámetro diastólico (DD); b)diámetro sistólico (DS); c)septum (S); d)pared posterior (PP); e) masa ventricular izquierda (MVI); f) fracción de acortamiento (FA).Se utilizó test de Mann-Whitney con alfa = 0.05.

Media ± DS	G1 ZRF (n=16)	G2 ZRL (n=16)	P
Sup.Corporal (cm2)	414.6 ± 71.1	364.8 ± 24.6	< 0.02
DD (cm)	0.75 ± 0.05	0.66 ± 0.03	< 0.01
DS (cm)	0.58 ± 0.06	0.45 ± 0.05	< 0.01
Septum (cm)	0.19 ± 0.01	0.16 ± 0.01	< 0.01
PP (cm)	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.01	< 0.01
MVI / Sup. (g/m2)	31.3 ± 5.8	21.9 ± 2.2	< 0.01
FA (%)	22.7 ± 8.4	31.5 ± 6.4	< 0.01

Los animales obesos mostraron diferencias significativas con respecto a sus pares no obesos. Estos hallazgos enfatizan las alteraciones morfológicas y funcionales del miocardio vinculada a la obesidad, aún en los períodos iniciales de esta enfermedad.

286. Intervalo QT del Electrocardiograma. Su relación con el período de reposo previo y con el ciclo eléctrico previo. María Bernasconi¹ Héctor Berra¹ Stella Bertoluzzo² Pablo Grigioni³ María Perrone⁴

¹Cát. de Fisiol Facde Cs Med UNR. ²Cát de Física Facde Bioq UNR. ³ Inst Polit Sup UNR ⁴ Bioing UNER grigiber@satlink.com Presentado por Adriana Torres

El intervalo QT del electrocardiograma (ECG) se asocia a arritmias ventriculares. El conocimiento de su dinámica latido a latido es limitado. La dependencia del QT respecto a la duración del ciclo eléctrico (RR) ha sido bien estudiada. La dependencia de la duración del potencial de acción respecto a la duración del período de reposo previo, ha sido estudiada in vitro, en células de Purkinje y en células ventriculares. **Objetivo:** Estudiar la relación QT/TQprevio (TQp), QT/RRprevio (RRp) y QT/RR, latido a latido, en reposo, y el grado en que correlacionan entre sí. **Método:** Se registraron ECGs continuos, en reposo, durante 20 seg. en 11 individuos sanos, varones y mujeres, sin antecedentes cardiovasculares y con examen físico negativo. Se utilizó la derivación V2. Se midieron los intervalos QT, RR y TQ. Se obtuvieron las relaciones QT/TQp, QT/RRp y QT/RR y sus coeficientes de correlación (R). **Resultados:** Las medias de los R de las relaciones QT/TQp y QT/RR fueron significativamente diferentes: 0.30±0.16 y 0.17±0.11 (p<0.5). Las medias de los R de las relaciones QT/RRp y QT/RR también lo fueron: 0.31±0.17 y 0.17±0.11(p<0.5). Las medias de los R de las relaciones QT/RRp y QT/TQp no mostraron diferencia significativa. **Conclusión:** Los valores de QT latido a latido, en reposo, parecen estar mejor correlacionados con la longitud del TQp y del RRp que con la del RR al cual pertenecen.

287. Homocisteinemia (Hcys) y polimorfismo de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en hipertensión esencial (HE). Victoria A. Garfunkel, Silvia I. García, Guillermo Dieuzeide, Tobias Kirsznern, Yankel Plotquin, Raúl J. Spataro, Claudio González, Carlos J. Pirola.

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari (UBA, Bs As), Hospital Zubizarreta (Bs As) y CAIDEM (Chacabuco).

La hiperHcys sería un factor de riesgo cardiovascular y estaría asociada a la variante C677T de la MTHFR, que participa en su metabolismo. Así, analizamos la asociación entre la Hcys y la variante C677T de la MTHFR con la HE. Se estudia-

ron 53 normotensos (NT, 55.1±8.7 años; 37 mujeres) y 127 hipertensos (HT, 58.8±9.1 años; 91 mujeres). No hubo diferencias significativas en la Hcys, ni en las frecuencias de los genotipos de la MTHFR, que están en equilibrio de Hardy-Weinberg, entre ambos (NT: 12.9±7.2 uM; CC: 43.4%, CT: 47.2%, TT: 9.4%; HT: 13.8 ± 9.6 uM; CC: 36.2%, CT: 48.0%, TT: 15.8%). La prevalencia de hiperHcys es alta (29.7%) en la población total. Ya que en población añosa el efecto de la edad y la dieta podrían disminuir el poder estadístico, se estudió una población estudiantil (Chacabuco). La prevalencia de hiperHcys en adolescentes fué mayor en los 49 HT vs 126 NT (16vs3%, OR:4.44 IC95:1.12-17.6 independientemente de la talla) y estuvo asociada al genotipo de la MTHFR (OR: 9.01, IC95: 2.24-36.1). En síntesis, la hiperHcys está asociada a la variante C677T de la MTHFR y a HE, y podría contribuir al mayor riesgo cardiovascular del hipertenso.

288. Efectos del precondicionamiento sobre el corazón isquémico de ratas alimentadas y ayunadas.

Alicia Varela, Gustavo Testoni, Gabriela Marina Prendes, Nancy Vázquez, Silvana Cerruti, Enrique Savino.

*Cátedra de Fisiología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, IQUIMEFA-CONICET.
e-mail: varela@huemul.ffyb.uba.ar*

Se estudiaron los efectos del precondicionamiento isquémico (PI) sobre el corazón perfundido Langendorff de ratas alimentadas (Al) (n=8) o ayunadas 24 h (Ay) (n=8), sometidos a 25 min de isquemia global (I) y 30 min de reperusión (RP). El PI consistió en un episodio de 3 min de I y 5 min de RP previos a la isquemia sostenida. La contractilidad se evaluó mediante la presión desarrollada (PD), las derivadas de la contracción (+dP/dT max) y relajación (-dP/dT max) y la presión diastólica final (PDF). La evaluación química del daño tisular se realizó midiendo la liberación de creatina quinasa (CK). Para el análisis estadístico se aplicó ANOVA y el test de Tukey. El PI disminuyó la PDF en las Al (10,75±7,71% vs 40,28±9,9% a los 25 min de I) y aceleró la recuperación post-isquémica de la contractilidad en ambos grupos (PD: 106,38±12,99% vs 25,45±5,63% p< 0,01; en Al y 122,25±13,42% vs 71,13±12,58% en Ay p<0,01; +dP/dTmax: 109,88±14,27% vs 35±4 % en Al, p<0,01 y 147,88±18% vs 103±17% en Ay, p<0,05; -dP/dTmax: 127,75±10% vs 67,6±10% en Al y 136,63±10,90% vs 81±13,65% en Ay a los 10 min de RP. El PI disminuyó las liberaciones de CK (56,4±17,5 vs 174,40±35,97 UI/l/gh) y de lactato (123±6 vs 172±13 umol/gh) medidas durante los primeros 5 min de RP, sólo en Al. Los resultados indican que el PI es beneficioso en ambas condiciones metabólicas. Su efecto fue más marcado en el grupo de alimentadas, acompañándose de una menor actividad glucolítica.

289. Estudio del canal de K rectificador anómalo (K_{IR}) en músculo liso vascular de arteria umbilical humana.

Alejandro Rebolledo, Jesica Raino, Alicia Gómez Alvis, Angela Grassi, Verónica Milesi.

Anatomía y Fisiología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. (veronica@nahuel.biol.unlp.edu.ar).

En músculo liso vascular (MLV) de algunos vasos se ha descrito la presencia del canal de K rectificador anómalo (K_{IR}), y se probó que participa en el mantenimiento del potencial de membrana. Nuestro objetivo fue demostrar la presencia y funcionalidad de canales K_{IR} en MLV de arteria umbilical humana (AUH). En células aisladas de MLV de este vaso, utilizando la técnica de patch-clamp en configuración de célula entera, pulsos hiperpolarizantes (rango: -80 a -120 mv) producen corrientes entrantes de K⁺ que rectifican y que tienen una amplitud de -231±43 pA a -140 mV (n=7), lo que indica la presencia de canales tipo K_{IR}. En experimentos de canal único se observó un canal de 23±1,5 pS de conductancia (n=6), que coincide con las conductancias observadas para K_{IR} en

MLV. Se sabe que en arterias cerebrales de rata y en coronarias porcinas, el canal K_{IR} está implicado en la vasodilatación producida por un pequeño aumento de la concentración de K⁺ extracelular (~ 10mM). Por lo tanto, realizamos curvas de fuerza contráctil versus concentración de K⁺ en anillos vasculares de AUH, y observamos que la concentración de K⁺ 10 mM produjo vasodilatación (-18,58±4,33 gF/gP, n=7), mientras que 20, 40, 60, y 80 mM produjeron sólo contracción. La vasodilatación por K⁺ 10 mM se inhibió (49,23 ± 18,78 %, n=7) con Ba²⁺ 100 uM, una concentración específica para bloquear canales K_{IR}, lo que sugiere la participación de estos canales en la relajación inducida por K⁺ en la AUH.

290. Monitoreo ambulatorio y genes en adolescentes con hipertensión de guardapolvo blanco.

Beatriz Grunfeld, Rosa Simsola, Mariela Bonanno, Patricia Porto, Miriam Romo, Silvia García, Carlos Pirola. Hospital de Niños R. Gutiérrez

Instituto A. Lanari. e-mail: bgrunfeld@intramed.net.ar

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de la presión arterial y frecuencia cardíaca en consultorio y por MAPA de adolescentes con hipertensión de guardapolvo blanco (GB) comparado con el de un grupo control (C) y un grupo de hipertensos (H). Se evaluaron además polimorfismos asociados a hipertensión esencial. Se estudiaron 44 adolescentes GB edad: x 13.5±2 años (r: 7 a 18); 19 M, 50 C apareados por sexo, edad, talla y peso (13.5±2 años, 21 M, y 54 H edad: x 12.7 años, (r: 5 a 18), 5 M; BMI 23±5. En un subgrupo de 36 C, 15 GB y 19 H se estudiaron las variantes I/D del gen de la ECA y M235T y T174M del gen del angiotensinogeno por PCR y RFLP o ASO. Resultados: En el consultorio los GB difieren de H solo por su frecuencia cardíaca más elevada (91±13 vs 83±11, p=0.002). Por MAPA los GB son similares a los C (p=NS). La prevalencia de alelos TT para la variante M235T del angiotensinogeno fue significativamente mayor en GB que en C (Fisher p<0.05; OR 5.25 -95%IC: 1.43-19.2). No hubo asociaciones con los otros genotipos estudiados. En conclusión El 45% de los adolescentes que consultan por hipertensión son hipertensos de GB. La FC en consultorio podría identificar a los GB. El polimorfismo TT de la variante M235T del angiotensinogeno estaría vinculado a la hipertensión de guardapolvo blanco, en forma similar a lo hallado en hipertensos esenciales.

GASTROENTEROLOGIA II

291. La inhibición de proteína quinasa C y la activación de proteína quinasa A contrarresta la disfunción hepatocanalicular inducida por estrés oxidativo en duplas de hepatocito aisladas de rata. I. Estudios funcionales. Marcelo Roma.

*Instituto de Fisiología Experimental. Piotr Milkiewicz, Jalal Ahmed-Chaudhury, Roger Coleman. School of Biosciences, University of Birmingham, United Kingdom. Presentado por Aldo Domingo Mottino.
e-mail: ifise1@citynet.net.ar*

El estrés oxidativo induce alteraciones en duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR) similares a aquellas inducidas por activación de proteína quinasa (PK) C. Dado que el estrés oxidativo induce activación de PKC, analizamos el papel de este mediador hormonal en dichas alteraciones. El inductor de estrés oxidativo t-butil-hidroperóxido (tBOOH, 100 uM) disminuyó un 41.4±2.4% (p<0.001) el % de DHAR que acumularon la sal biliar fluorescente coilil-lisilfluoresceína (CLF), así como su capacidad para retenerla luego de 15 min de excretada (-50.8±2.3%, p<0.001). Estos efectos fueron completamente prevenidos por los H7 (100 uM) y estaurosporina (1 uM), Gö 6976 (2 uM), tres inhibidores de PKC, por BAPTA/AM (20 uM), un quelante intracelular de Ca²⁺, y por dibutylryl-cAMP (DBcAMP,

500 μ M), un análogo permeable de AMPc. El efecto preventivo de DBcAMP fue bloqueado por KT5720, un inhibidor de PKA. Estos dos agentes no solo previnieron sino que también revirtieron completamente, en 50-60 min, las alteraciones inducidas por tBOOH. Estos resultados indican que el estrés oxidativo altera la capacidad de las DAHR para acumular CLF al afectar principalmente su permeabilidad paracelular. Este efecto estaría mediado por activación mediada por Ca^{2+} de PKC, cuya acción sería contrabalanceada por activación de PKA.

292. La inhibición de proteína quinasa C y la activación de proteína quinasa A contrarresta la disfunción hepatocanalicular inducida por estrés oxidativo en duplas de hepatocito aisladas de rata. II. Estudios morfológicos. Marcelo Roma. Instituto de Fisiología Experimental. Piotr Milkiewicz, Jalal Ahmed-Chaudhury, Roger Coleman.

School of Biosciences, University of Birmingham, United Kingdom. Presentado por Aldo Domingo Mottino. e-mail: ifise1@citynet.net.ar

En un trabajo previo, demostramos que el inductor de estrés oxidativo *t*-butil-hidroperóxido (tBOOH) altera la capacidad de duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR) para acumular sustratos en su vacuola canalicular al afectar principalmente su permeabilidad paracelular y que este efecto es contrarrestado por inhibición de proteína quinasa (PK) C o activación de PKA. Dado que se ha sugerido una relación funcional entre componentes de la *zonula ocludens* y el citoesqueleto de actina, analizamos si tBOOH afecta la redistribución de ambas y si tal efecto es prevenido por inhibición de PKC o activación de PKA. tBOOH (100 μ M) aumentó el % de DAHR que exhibían ampollas de membrana, un marcador preliminar de desorganización del citoesqueleto de actina (de 16% \pm 1% a 63% \pm 2%, $p < 0.001$). tBOOH produjo además una extensiva redistribución de actina y de los componentes de la *zonula ocludens* ocludina y ZO-1, examinados por histoquímica de fluorescencia. El pretratamiento de las DAHR con el inhibidor de PKC H7 (100 μ M) y el activador de PKA dibutyl-*c*-AMP (500 μ M) contrarrestó completamente estos efectos. Los resultados sugieren que el estrés oxidativo incrementa la permeabilidad paracelular vía desorganización de actina. Este efecto estaría mediado por activación de PKC y sería contrabalanceado por activación de PKA.

293. Silimarina (SIL) previene la colestasis por taurolitocolato (TLC) en la rata. Fernando Crocenzi, Enrique Sánchez Pozzi, José Pellegrino, Aldo Mottino, Emilio Rodríguez Garay y Marcelo Roma.

Instituto de Fisiología Experimental-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. e-mail: ifise1@citynet.net.ar

La sal biliar (SB) TLC ha sido asociada causalmente a colestasis ocasionada por nutrición parenteral y enfermedad de Byler, entre otras. Indagamos si el hepatoprotector SIL (100 mg/kg/día x 5 días, i.p.) previene la colestasis inducida por la administración aguda de TLC (3 μ mol/100 g p.c., i.v.) en ratas Wistar machos. SIL previno la disminución del flujo biliar (FB) y de la excreción biliar (E) de SB totales, glutatión (GSH) y HCO_3^- (% del valor basal), luego de 20 min de administrar TLC (FB: 23,7 \pm 1,6 vs 54,5 \pm 5,0, $p < 0,005$; ESB: 33,5 \pm 3,8 vs 75,2 \pm 0,7, $p < 0,025$; EGS: 19,3 \pm 0,7 vs 39,7 \pm 5,2, $p < 0,05$; $EHCO_3^-$: 20,1 \pm 1,0 vs 36,0 \pm 0,5, $p < 0,05$). SIL previno la disminución de las constantes intrínsecas de transferencia hígado-bilis de bromosulfotaleína (BSF) y de la SB taurocolato (TC) (BSF: 0,049 \pm 0,006 vs 0,112 \pm 0,009 min^{-1} , $p < 0,05$; TC: 0,09 \pm 0,02 vs 0,19 \pm 0,03 min^{-1} , $p < 0,05$). SIL aumentó la capacidad hepática para depurar TLC a los 20 min de su administración, incrementando tanto su propia excreción biliar (1,3 \pm 0,4 vs 3,5 \pm 0,6 nmol/min/g híg, $p < 0,025$), como la de sus principales metabolitos (muricolato: 5,6 \pm 1,1 vs 13,1 \pm 1,7 nmol/min/g híg, $p < 0,05$ y

muridesoxicolato: 1,4 \pm 0,4 vs 3,7 \pm 0,5 nmol/min/g híg, $p < 0,05$). Se concluye que SIL es capaz de prevenir los efectos colestásicos de TLC. La capacidad aumentada del hígado para depurarlo cumpliría un papel fundamental en su efecto anticoléstató.

294. Colestasis por etinilestradiol (EE). Papel de la concentración hepática de ácido UDP-glucurónico (UDPGA). Fernando Crocenzi, José Pellegrino y Enrique Sánchez Pozzi.

Instituto de Fisiología Experimental, CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. e-mail: ifise1@citynet.net.ar.

EE 17-glucurónido es un derivado colestático de EE que podría participar en el desarrollo de la colestasis. Para evaluar el papel de la glucuronización, se modificó la concentración hepática de UDPGA mediante galactosamina (Gal) y uridina (Ur). En ratas controles, Gal (200 mg/kg peso) redujo la concentración de UDPGA (μ mol/g hígado) de 0,42 \pm 0,05 basal, a 0,34 \pm 0,03 a 1 h y a 0,06 \pm 0,01 a 2 hs mientras que la co-inyección de Ur (0,9 g/kg peso) previno la disminución por Gal (0,70 \pm 0,14 a 2 hs). **Métodos:** ratas Wistar machos se dividieron en: C (control), EE (5 mg EE/kg peso/día, por 5 días), EG (EE más administración de Gal 200 mg/kg peso/día 2 hs antes de administración de EE), EGU (EE+Gal más co-administración de Ur 0,9 g/kg peso/día junto a Gal). Se evaluó flujo biliar (FB, μ l/min g híg.), excreción biliar de sales biliares (ESB, nmol/min g híg) y excreción biliar de glutatión (GSH, nmol/min/kg peso). **Resultados:** FB: C: 1,9 \pm 0,2, EE: 1,0 \pm 0,1^a; EG: 1,5 \pm 0,2^{b,c}; EGU: 1,0 \pm 0,2^a; ESB: C: 37 \pm 6, EE: 21 \pm 4^a, EG: 29 \pm 6^b, EGU: 32 \pm 9^b; GSH: C: 95 \pm 13; EE: 4 \pm 4^a, EG: 3 \pm 3^a, EGU: 3 \pm 3^a. ^aDiferente del C, ^bdiferente de E, ^cdiferente de EGU ($p < 0,05$). **Conclusión:** La glucuronización de EE estaría vinculada con la disminución de la fracción dependiente de sales biliares producida por el estrógeno pero no a la disminución de la fracción dependiente de GSH en la que participarían otros mecanismos.

295. Modelo de hipertensión portal con edema cerebral e hiperamonemia. Eizayaga Francisco*, Castro José**, Scorticati Camila*, Ruibal Andrea*, Romay Salvador*, Lemberg Abraham*, Perazzo Juan*.

Cáted. de Fisiopatología y Farmacología**, FF y B, UBA. jperazzo@ffy.uba.ar*

Introducción: La hipertensión portal (HP) prehepática experimental presenta daño hepático leve sin encefalopatía. Para establecer un modelo con mayor alteración hepática y cerebral estudiamos grupos con estrechez reglada de la vena porta (ERVP) y paracetamol (APAP). MATERIALES Y METODOS: 4 grupos (G) de ratas Wistar macho (220 g), n=6 por grupo. G1: Operación simulada. GII: ERVP. GIII: APAP 0,75g/kg/día, durante 2 días, intraperitoneal. GIV: APAP + ERVP. Se determinó el porcentaje de agua cerebral por el método gravimétrico. Se dosó NH4+, ALAT, ASAT, urea, glucosa, creatinina y se evaluó la histopatología hepática. RESULTADOS: %H₂O/g cerebro: G1: 78,95 \pm 0,18. GII: 79,21 \pm 0,20. GIII: 79,89 \pm 0,19*. GIV: 79,67 \pm 0,11*. NH4+ (μ M/l). G1: 23 \pm 9. GII: 79 \pm 15*. GIII: 72 \pm 14*. GIV: 101 \pm 11*. ASAT (UI/l), G1: 267 \pm 42. GII: 462 \pm 88. GIII: 734 \pm 63*. GIV: 655 \pm 58*. ALAT (UI/l) G1: 83 \pm 9. GII: 135 \pm 19. GIII: 286 \pm 42*. GIV: 328 \pm 61*. (* $p < 0,05$ vs G1). Histología: G1 normal. GII: necrosis focal mínima. GIII: necrosis hemorrágica difusa. GIV: necrosis focal hemorrágica confluyente. CONCLUSIÓN: En este modelo de ERVP más APAP se produce hipertensión portal, daño hepático, hiperamonemia y edema cortical cerebral.

296. Cambios en la barrera hematoencefálica del hipocampo en ratas hipertensas portales. Ruibal Andrea, Grinson Diana, Scorticati Camila, Eizayaga Francisco, Iacono Rubén, Lemberg Abraham, Perazzo Juan.

Cátedras de Fisiopatología, Biología Celular, Inmunología. FFyB, UBA.
e-mail: jperazzo@ffyb.uba.ar

Introducción: En trabajos previos describimos cambios en astrocitos (A) y capilares (C) del área CA4 del hipocampo en ratas con hipertensión portal prehepática (HPP). Al área CA1 del hipocampo se le asigna relevancia en conducta y aprendizaje. Se decidió estudiar la HPP y la barrera hematoencefálica (BHE) en CA1. **Materiales y Métodos:** Se usaron ratas Wistar macho divididas en: Grupo (G) I (n=7) HPP por estrechez de la vena porta, GII (n=4) ratas simil-operadas y GIII (n=6) control. A los 14 días se sacrificaron, se extrajo cerebro y se incluyó en parafina. Se midió por inmunohistoquímica la expresión del factor von Willebrand en células endoteliales y proteína glial fibrilar ácida en A del área CA1 con anticuerpos monoclonales-avidina-biotina. **Resultados:** por análisis de imágenes hubo aumento significativo en: número de C y de A por campo: C: GI= 5.67 ± 0.17*; GII:3.63 ± 0.2; GIII:3.75 ± 0.11 y A: GI= 4.82 ± 0.18*; GII:3.10 ± 0.12; GIII:3.72 ± 0.22; área inmunoreactiva en: C: GI= 3288 ± 237*; GII:1781 ± 189; GIII: 1821 ± 98 y A: GI= 31409 ± 983*; GII: 26523 ± 1055; GIII:22968 ± 1259, y cantidad de antígeno detectado en C GI= 239 ± 21*; GII:120 ± 15; GIII:114 ± 8; *GI vs GII y GIII p<0.0001. **Conclusiones:** Los resultados muestran alteración de la BHE en el área CA1 del hipocampo de ratas HPP.

297. Efecto del LPS sobre la acción citotóxica de la toxina Shiga en colon de rata. Fernando Martín, Mariano Fernández Miyakawa, Elsa Zotta, Claudia Silberstein y Cristina Ibarra.

Laboratorio de Fisiopatología, Depto. Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.
e-mail: ibarra@fmed.uba.ar

En estudios previos hemos observado que los sobrenadantes de *E. coli* recombinante conteniendo toxina shiga tipo 2 (Stx2) produjeron una inhibición de la absorción neta de agua y una destrucción del 1/3 superior de la mucosa colónica humana y de rata. Estos efectos fueron similares a los observados por Stx2 purificada pero a una dosis citotóxica 100 veces menor, lo que indica que otros factores adicionales presentes en el sobrenadante bacteriano contribuirían a la acción citotóxica de la toxina. El objetivo del presente trabajo es evaluar la acción del LPS de *E. coli* sobre los efectos de Stx2 en colon de rata. El tejido fue montado a manera de diafragma en cámara de Ussing, bañado con solución salina, burbujeadado con 95%O₂/5%CO₂ y mantenido a 37°C. El flujo neto de agua (Jw) y la corriente de cortocircuito (Isc) fueron simultáneamente medidos antes y después del agregado de Stx2 (LPS al lado mucoso del tejido. Stx2 (3,15ng/ml) en presencia pero no en ausencia de LPS (10µg/ml) inhibió el Jw y produjo una pérdida del 1/3 superior de la mucosa colónica al cabo de 60 min de incubación. Sin embargo a una concentración de Stx2 10 veces mayor y en ausencia de LPS, la toxina fue capaz de producir los mismos efectos antes descriptos. En las distintas condiciones experimentales no se observó cambios en los parámetros eléctricos. Los resultados demuestran que la presencia de LPS potencia en forma significativa la acción enterotóxica de Stx2.

298. Expresión de la proteína transportadora de aniones orgánicos mrp2 en intestino delgado de rata durante la preñez y lactancia. Aldo Mottino, Timothy Hoffman, Lothar Jennes, Jingsong Cao, Mary Vore.

Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario y Departamento de Farmacología, Escuela de Medicina, Universidad de Kentucky, EEUU. e-mail: ifise1@citynet.net.ar.

Mrp2 se expresa en membrana apical de enterocito y transporta compuestos conjugados con glutatión, sulfato y ácido

glucurónico a la luz intestinal. Se analizó la expresión de mrp2 en intestino delgado de rata hembra durante la preñez (19-21 días de preñez) y lactancia (2-4, 10-14 y 21 días posparto), utilizándose como controles ratas hembras vírgenes. Se analizó el contenido de mrp2 por «western blot» en preparación de membrana apical de enterocito, a lo largo del intestino, desde el píloro a la válvula ileocecal. El nivel de mrp2 fue máximo en la región proximal para todos los grupos experimentales, no se afectó en las ratas preñadas y se incrementó en un 100 % en las ratas posparto al final de la lactancia. El análisis del contenido del ARNm por «northern blot» reveló una correlación positiva con los niveles de proteína. El transporte de glutatión-S-dinitrofenol (sustrato de mrp2) desde la célula intestinal hacia el lumen fue evaluado utilizando el modelo de sacos intestinales aislados y evertidos. Los resultados muestran que el transporte no se alteró en ratas preñadas y se incrementó en ratas posparto. Considerando que las ratas en lactancia ingieren de 2 a 4 veces más alimento que las controles, el incremento observado en ARNm, proteína y transporte sugieren un mecanismo de adaptación para minimizar la toxicidad de los xenobióticos incorporados con la dieta.

TRANSDUCCION DE SEÑALES III

299. MAP-quinasas en el nucleo supraquiasmático: regulación por el reloj biológico y por la luz. Gastón Pizzio, Gabriela Ferreyra, Omar Coso, Diego Golombek.

*Univ. Nacional de Quilmes, *Lab. de Fisiología y Biología Molecular, Fac. Cs. Exactas y Naturales, UBA.*
dgolombek@unq.edu.ar.

El reloj biológico de mamíferos se localiza en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo y regula la actividad circadiana del organismo, sincronizándose principalmente por luz ambiental. Una de las señales para la sincronización es la activación de proteínas quinasas en los NSQ. En este trabajo analizamos la expresión y activación de tres MAPKs (mitogen-activated protein kinases) «clásicas» en los NSQ: p38/HOG, JNK (cJun-Kinase) y Erk-2 (extracelular-regulated kinase 2). No observamos variaciones en la cantidad total de las 3 MAPKs a lo largo del día o bajo condiciones de oscuridad constante. En los casos de p38 y Erk-2 se observó una variación diaria en la presencia de la enzima fosforilada (pp38 y pErk-2, respectivamente), con picos durante la fase de luz (ZT8). Por otra parte, estas dos MAPKs presentaron una activación significativa (evidenciada por un marcado aumento en su fosforilación) luego de pulsos de luz de 5 o 15 minutos de duración durante la noche subjetiva (CT 18) dentro de un ciclo circadiano de oscuridad constante. Estos pulsos de luz afectan la fase de oscilación del reloj circadiano, actuando como sincronizadores de los ritmos. Estos resultados indican que la activación de las MAPKs presenta un ritmo diario, y responden a pulsos de luz que afectan la actividad del reloj biológico.

300. Efecto del estradiol sobre el calcio citosólico de plaquetas humanas. Oscar Gende.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Fac. de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata.
e-mail: cicme@atlas.med.unlp.edu.ar.

En diversos tejidos se han descrito alteraciones en los movimientos de calcio por efectos no genómicos de hormonas esteroides. Para establecer si el estradiol es capaz de modificar el calcio citosólico ([Ca²⁺]_i) en plaquetas humanas, suspensiones cargadas con el indicador fluorescente FURA-2 se incubaron 5 min. en 17 alfa estradiol (αEstr) o 17 beta estradiol (βEstr) 100 µM. Durante la incubación con αEstr en [Ca²⁺]_o= 5µM se produjo un significativo (*: P < 0.05, droga vs solvente) aumento del calcio citosólico ([Ca²⁺]_i: 15± 4 nM * vs 5± 1 nM) que no se observó con βEstr (4± 1 nM vs 3± 1 nM). Al pasar a [Ca²⁺]_o= 1µM se produjo un aumento de [Ca²⁺]_i distinto del control en αEstr pero no en βEstr (41± 5 nM * vs 14± 3 y

19± 2 vs 21± 5 respectivamente). Cuando luego de incubar 5 min. en $[Ca^{2+}]_i = 5\mu M$ se estimularon las plaquetas con 0.1 UI de trombina se produjo un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ similar en presencia de droga o de su solvente. Después de 50 segundos se pasó a $[Ca^{2+}]_o = 1mM$ lo que produjo un pico de $[Ca^{2+}]_i$ mayor en α Estr que en el control ($186 \pm 12 nM$ * vs $146 \pm 18 nM$), sin que en β Estr se observaran diferencias significativas de la respuesta ($142 \pm 24 nM$ vs $158 \pm 17 nM$). Se concluye que las plaquetas sanguíneas no responden al isómero natural, pero el α Estr es capaz de producir el ingreso de calcio al citosol.

301. Expresión de iNOS en aurícula y su regulación por el factor nuclear kB y por prostanoïdes en un modelo de shock endotóxico murino. Nora Goren, Cristina Cerquetti, Aurea Navarro*, Ramón Bartrons*.

CEFYBO-CONICET y *Universidad de Barcelona, España. (ngoren@cefybo.edu.ar)

Durante el shock endotóxico (SE) los lipopolisacáridos (LPS) son disparadores de las respuestas que generan las bacterias Gram(-) en corazón. Los prostanoïdes y el óxido nítrico (NO) son responsables de muchas de las manifestaciones causadas por LPS. Se estudiaron las modificaciones en la actividad de la NOS, por la formación de ^{14}C -Citruilina, en aurículas murinas en un modelo de SE. La actividad de NOS (pmol/g tejido) aumentó en animales inyectados con LPS respecto de los controles (766 ± 72 vs 416 ± 31). La actividad fue inhibida por ácido dietilcarbámico (DC) (483 ± 46), dexametasona (542 ± 48) y aminoguanidina (530 ± 43). Meloxicam (Mx) también inhibió la actividad de NOS (423 ± 19) pero no así la indometacina (673 ± 49). La expresión del ARNm de iNOS se analizó por RT-PCR. Las aurículas de animales tratados con LPS mostraron una banda compatible con cADN de 262 pb. Dicha banda estuvo ausente en aurículas controles y en tratadas con LPS+DC y LPS+Mx. La expresión de ARNm de cox-2 se visualizó como una banda de 336 pb en animales tratados con LPS, LPS+DC y LPS+Mx pero no en aurículas controles. Los resultados sugerirían que la actividad aumentada de NOS en aurículas de ratones con SE se debe a la iNOS. El factor nuclear kB estaría regulando su expresión ya que DC inhibió tanto la expresión del ARNm como la actividad enzimática. Los prostanoïdes participarían en la inhibición de la expresión y actividad de iNOS.

302. El receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-IR) regula la actividad mitogénica de heregulina (HRG), ligando de los receptores ErbBs (ErbB-2, 3 y -4), en las células de cáncer de mama humano MCF-7. Cecilia Proietti, Leticia Labriola, Federico Movsichoff, Mariana Salatino, Stella Vazquez, Isabel Luthy, Leonardo Bussman, Michele Bianchini, Tomás Santa Coloma, Eduardo Charreau, Patricia Elizalde.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, CONICET), Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar. Buenos Aires. e-mail: Elizalde@dna.uba.ar

La HRG estimula la proliferación de las células de cáncer de mama MCF-7 y el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) aumenta ($p < 0.001$) el efecto proliferativo de HRG en esas células [incorporación de (3H)timidina: 0.1% suero: 17880 ± 1800 ; HRG (0.2 ng/ml): 43120 ± 3328 ; IGF-I+HRG: 59330 ± 6344 cpm]. Tanto oligodesoxinucleótidos antisentido (ASODNs) al ErbB-2 como ASODNs al IGF-IR resultan en la total inhibición del efecto proliferativo de HRG. IGF-I aumentó la capacidad de HRG de fosforilar en tirosina al ErbB-2. Estos resultados indican cross-talks entre IGF-I/IGF-IR y HRG/ErbB-2. Investigamos la posibilidad de una asociación física entre ambos receptores como primer mecanismo de interacción. Las células se estimularon con HRG o IGF-I, los extractos proteicos se inmunoprecipitaron con un anticuerpo

anti-ErbB-2 y el Western blot se reveló con anticuerpos anti-IGF-IR cadenas ? y ?? HRG e IGF-I indujeron la formación de un complejo binario entre ErbB-2 e IGF-I. Utilizando microscopía confocal se observó la colocalización de ambos receptores inducida por HRG. Estos resultados demuestran una interacción jerárquica entre HRG/ErbB-2 e IGF-I/IGF-IR, que involucra la asociación entre ambos receptores, y en la cual i) IGF-I potencia la activación de ErbB-2 inducida por HRG y la capacidad mitogénica de HRG y ii) el bloqueo de IGF-IR inhibe la proliferación inducida por HRG.

303. Participación de serina/treonina fosfatasa en el mecanismo de acción de hormonas esteroïdogénicas. Cecilia Poderoso, Alejandra Gorostizaga, Fabiana Cornejo Maciel, Cristina Paz y Ernesto Podestá.

Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. e-mail: crispaz@fmed.uba.ar

Es conocido que la activación de Ser/Tre quinasas y la fosforilación de proteínas que regulan el acceso de colesterol a la mitocondria son eventos claves en el mecanismo de acción de hormonas esteroïdogénicas. Dado que el grado de fosforilación depende del balance entre las actividades de quinasas y fosfatasa, el objetivo de este trabajo fue investigar el rol de las Ser/Tre fosfatasa en el mecanismo de acción de hCG, utilizando inhibidores permeables de estas enzimas. Caliculina A (CA) inhibió la producción de testosterona (T) en células de Leydig de rata (ng T/10⁶ células): Control= $4,7 \pm 0,2$; hCG= $16,1 \pm 1,5$; 8BrAMPc= $19,4 \pm 1,5$; vs Control = $4,0 \pm 0,2$; hCG= $4,6 \pm 1,0$ ($P < 0,001$); 8BrAMPc= $4,5 \pm 1,0$ ($P < 0,001$), en presencia de 100 nM de CA. El efecto fue dependiente de la dosis (1-100 nM) y no se evidenció sobre la síntesis de T sostenida a partir de 22(R)OHcolesterol. Cantaridina, otro compuesto que al igual que CA inhibe con igual potencia a las Ser/Tre fosfatasa PP1 y PP2A, produjo un efecto similar. Más aún, ambos compuestos también inhibieron la esteroïdogénesis estimulada por ACTH en células de zona fasciculata de adrenal de rata. Se concluye que otro componente obligatorio del mecanismo de acción de hCG es la desfosforilación de proteínas mediada por PP1/PP2A. Dado el amplio espectro de sustratos de estas enzimas y que los procesos de fosforilación deben ocurrir simultáneamente, se infiere que en el mecanismo de acción de hormonas esteroïdogénicas, quinasas y fosfatasa actúan en compartimentos diferentes.

304. Proteína tirosina fosfatasa (PTP) regulan la esteroïdogénesis a través de la estimulación de la expresión de StAR. Fabiana Cornejo Maciel, Paula Maloberti, Douglas Stocco, Cristina Paz, Ernesto Podestá.

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Department of Cell Biology and Biochemistry, Texas Tech University Health Sciences Center. Lubbock, Texas. (fcornejo@fmed.uba.ar)

Previamente demostramos que LH/hCG incrementan la actividad de proteína tirosina fosfatasa (PTP) y que la actividad de estas enzimas es un requerimiento obligatorio para la activación hormonal de la esteroïdogénesis, actuando en un sitio localizado entre la activación de la PKA y el transporte del colesterol al complejo citocromo P450_{sc}. En este trabajo se investigó el sitio de acción de las PTP, analizando la expresión de la proteína StAR, cuyo rol regulatorio en la activación hormonal de la producción de esteroides está ampliamente demostrado. Con este objetivo, se analizaron los niveles de la proteína StAR y de su mensajero por Western y Northern blot en células de Leydig de la línea MA-10 bajo estímulo con 8Br-AMPc en presencia de óxido de fenilarsina (PAO), inhibidor permeable de PTP. Como está descrito, 8Br-AMPc (1 mM) incrementa los niveles de la proteína StAR, efecto que no se observa cuando la estimulación se realiza en presencia de 2

uM de PAO (densidad óptica relativa StAR/P450: control 0,52; 8Br-AMPc 6,25; PAO 0,31; PAO + 8Br-AMPc 0,71 unidades arbitrarias). Resultados similares se obtienen cuando se evalúan los niveles del mensajero correspondiente. Se concluye que PTPs regulan la esteroidogénesis a través de la estimulación de la expresión de StAR.

305. Efecto de la adenosina sobre los canales de calcio voltaje-dependientes (CCVD) vinculados a la liberación espontánea de acetilcolina (ACh). Adriana Losavio, Silvana De Lorenzo, Salomón Muchnik.

Laboratorio de Neurofisiología. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. (alosavio@mail.retina.ar)

En las terminales nerviosas motoras la adenosina (AD) que se une a sus receptores A1, produce inhibición presináptica (IP) de la liberación espontánea de ACh. Con el propósito de investigar si esta acción se debe en parte a una disminución de la corriente de Ca^{2+} a través de los CCVD vinculados a la liberación espontánea, se estudió el efecto de la AD 100 uM (% de IP 37.0 ± 5.9 , n: 6) y un agonista específico de los receptores A1 2 cloro-N6-ciclopentil adenosina (CCPA 100 uM) (% de IP 46.7 ± 5.8 , n:6) sobre la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPPs) registrados en músculo diafragmático de ratones CF1 previamente incubados con nitrendipina 5 uM (Nit) y/o ω -Conotoxina GVIA 5 uM (ω -CgTx), bloqueantes específicos de los CCVD tipo L y N, respectivamente. Los resultados muestran que el efecto de AD es oculto en presencia de ambos antagonistas, ya que ω -CgTx disminuyó (\downarrow) la fMEPPs un $42.5 \pm 9.9\%$, la adición de Nit un $62.6 \pm 5.1\%$ y el posterior agregado de AD no modificó fMEPPs ($62.0 \pm 11.6\%$). Para estudiar sobre que componente del influjo de Ca^{2+} actúa la AD, se midió fMEPPs en CCPA y posteriormente en presencia de los bloqueantes individuales: % \downarrow de fMEPPs en CCPA 46.3 ± 7.4 y en CCPA + Nit 40.3 ± 7.9 , n=4; % \downarrow de fMEPPs en CCPA 48.3 ± 5.7 y en CCPA + ω -CgTx 65.0 ± 5.9 , n=4. Las secuencias inversas por ej. Nit y luego Nit + CCPA evidenciaron comportamientos similares. Estos resultados sugieren que la IP inducida por AD sobre la liberación espontánea de ACh se debe en parte a una reducción del componente del influjo de Ca^{2+} que pasa a través de los CCVD tipo L.

306. Respuesta hipoosmolar (RH) del transporte activo de Na^+ en músculo esquelético. Roque Venosa.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. (rvenosa@atlas.med.unlp.edu.ar).

La hipoosmolaridad estimula el transporte activo de Na^+ en músculo esquelético (Venosa, 1978) y aumenta la densidad de bombas de Na^+ del sarcolema (Venosa, 1991). Se investigó el mecanismo de este efecto mediante determinaciones de flujos de Na^+ y fijación de ouabaína en diversas condiciones experimentales en músculo sartorio de rana. En otras células se sugirió que la RH dependería de la activación de tirosina cinasas. En estos experimentos ginesteína (100 uM, inhibidor de tirosina cinasas) no modificó la RH por reducción de la presión osmótica normal (P_1) a la mitad ($P_{0.5}$). Considerando el estiramiento sarcolemal en la RH, se estudió el rol de dos componentes del citoesqueleto en la RH: a) colchicina (100 uM), un desestabilizante de los microtúbulos, no la alteró; b) citocalasina (5 uM), despolimerizante de la F-actina, la redujo en un 40%. La RH también ocurrió cuando músculos equilibrados en medio hipertónico (P_2) se expusieron a P_1 ; además del aumento del flujo activo de Na^+ , la densidad de bombas se incrementó de 2683 ± 220 en P_2 a 4787 ± 1070 cm^{-2} en P_1 , un incremento comparable al de la RH $P_1(3500 \pm 310) \rightarrow P_{0.5}(4860 \pm 160)$. La RH $P_2 \rightarrow P_1$ no fue alterada por citocalasina o colchicina. Los datos sugieren la participación del citoesqueleto (microfilamentos) en la activación de la RH $P_1 \rightarrow P_{0.5}$, no así en la RH $P_2 \rightarrow P_1$, pero ambas situaciones, don-

de hay estiramiento de membrana, producen aumento del transporte activo de Na^+ y sobreexpresión de la (Na^+K^+) ATPasa sarcolemal.

COMUNICACIONES EN POSTERS

GASTROENTEROLOGIA III

307. Efectos combinados del aluminio y del silicio sobre la captación de calcio in vitro por enterocitos aislados de pollo. Daniel Orihuela, Verónica Meichtry.

Cátedra Fisiología Humana. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe. (e-mail: dorihuela@arnet.com.ar)

El silicato sódico (Sil) reduce la absorción intestinal del aluminio (Al) y podría prevenir la toxicidad del metal. Se utilizó un modelo de células duodenales aisladas de pollo para analizar los efectos del Sil y del Al (como lactato, LAI) sobre la captación de calcio (CCa). Enterocitos de pollo obtenidos por el método de Liang *et al.*, se preincubaron *in vitro* (2×10^5 células viables/tubo) 30 min. a $37^\circ C$ en aerobiosis con 0, 50 y 100 uM de LAI en las siguientes condiciones experimentales: (a) Sil 30 uM, (b) Sil 150 uM, (c) Nifedipina (Nif) 1 uM, (d) A23187 1 nM, (e) Sil 150 uM + Nif 1 uM, (f) Sil 150 uM + A23187 1 nM y (g) vehículos. Se incubó con 0,5 uCi Ca^{45} por 5 min. y se midió la radiactividad remanente en el pellet. En el grupo (g) tanto 50 como 100 uM de LAI redujeron la CCa respecto del control sin Al (CCa en nmol Ca/mg proteínas: LAI 0 = $13,02 \pm 3,30$; LAI 50 = $8,59 \pm 1,81^*$; LAI 100 = $2,87 \pm 0,93^*$; n = 8, *P < 0,05). En (b) Sil 150 uM evitó la disminución de CCa producida por 50 uM de LAI. En (c) Nif 1 uM anuló la inhibición de CCa producida por el LAI. En (d) la CCa estimulada por A23187 fue significativamente reducida por LAI 100 uM. En (f) Sil 150 uM anuló la reducción de CCa producida por LAI 100 uM. La cinética de la CCa fue afectada por LAI 100 uM (pendiente de la gráfica CCa vs. $[Ca^{2+}]$ variando de 0 a 2 mM: LAI 0 = $9,58 \pm 0,56$; LAI 100 = $6,53 \pm 0,41$, P < 0,05) y el agregado de Sil 150 uM previno este efecto. Se concluye que el Al actuando sobre los canales de calcio redujo la CCa *in vitro* por los enterocitos de pollo. El Sil a la mayor concentración ensayada fue capaz de evitar esta reducción y podría ser útil para atemperar los efectos deletéreos del Al sobre el metabolismo del calcio.

308. Solución de la Universidad de Wisconsin (UW) y Oxido Nítrico (NO): Nitroprusiato de Sodio (NPNa) vs S-Nitrosoglutation (GSNO). ¹Alejandra Quintana, ²Edgardo Guibert, Angel Scandizzi, ¹Alejandra Martínez y Joaquín Rodríguez.

¹Morfología, ²Biología Molecular, Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. e-mail: aleq@arnet.com.ar

Las condiciones de preservación fría/reperfusión y las concentraciones de NO en la solución UW (48hs-4°C) tienen efectos correlacionados sobre el parénquima y el estroma hepático. Estudios anteriores demostraron que 500uM NPNa o 100uM GSNO conserva la morfología hepática post preservación/reperfusión. Se comparó el efecto de ambos dadores de NO agregados a la UW sobre hígados de ratas Wistar adultas, posteriormente reperfundidos (1h) utilizando un modelo de hígado aislado. Finalizada la reperfusión (R) con Krebs-Henseleit/Albúmina bovina 2%, se obtuvieron biopsias para el estudio del parénquima (hematoxilina/eosina e inmunohistoquímica para Albúmina) y del estroma (Picrosirius red y Sales de Plata). A las 48 hs el grupo UW+R mostró extensa vacuolización centrolobulillar, blebs, células endoteliales sinusoidales desprendidas, trama colágena desorganizada y distribución preferentemente perivenosa de Albúmina. En los

grupos 500uM NPNa o 100uM GSNO+R, se obtuvo ligera o ausente vacuolización perivenosa con escasas células endoteliales sinusoidales desprendidas, trama colágena organizada y distribución homogénea de Albúmina. Concluimos que la adición de 500uM NPNa o 100uM GSNO a la UW, es igualmente efectiva para revertir daños morfológicos por preservación fría/reperfusión.

309. La depleción de ATP podría condicionar la síntesis de Glutation (GSH) en hepatocitos sometidos a preservación /reoxigenación. María Mamprin, Joaquín Rodríguez y Edgardo Guibert.

¹ Biología Molecular. Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531. mariamamprin@yahoo.com

En este trabajo se preservaron hepatocitos de rata (HC) en Sol. de la Universidad de Wisconsin (4°C, N₂) y se estudió la síntesis de GSH y el contenido de ATP en la reoxigenación, con el fin de evaluar los posibles cambios que se producen durante la anoxia y que se manifiestan en la reoxigenación. Se realizaron dos grupos experimentales: **I)** HC recién aislados, lavados con Krebs-Henseleit (KH), depletados de GSH con Dietilmaleato (DEM) 2mM y reoxigenados (120min, 37°C, carbógeno) en dos Sol. de reoxigenación: KH y KH enriquecido (KHRe) (+ Metionina 0.5mM, Serina 1mM, Glutamina 5mM y Glicina 1mM). **II)** HC preservados 72 hs, lavados con KH y sometidos al mismo tratamiento con DEM y al proceso de reoxigenación que los controles. Durante la reoxigenación en alícuotas se determinó: la liberación de LDH (%), la síntesis de GSH (nmol/10⁶cél/min) y el contenido de ATP (nmol/10⁶cél) con el fin de establecer una relación entre la síntesis de GSH y los niveles de ATP. El **Grupo-I** mostró a los 120 min. una mayor síntesis neta de GSH (calculada como la diferencia entre la síntesis de GSH obtenida en KHe y la obtenida en KH) 0.51±0.33 vs 0.37±0.13* (n=4) y un mayor contenido de ATP 16.8±1.4 vs 10.34± 2.3* (n=3). Se concluye que la menor disponibilidad de ATP obtenida en los HC preservados podría condicionar la síntesis de GSH durante la reoxigenación post-preservación.

310. Incremento del Fosfato Inorgánico Biliar (Pi) en la preservación hipotérmica-reperfusión del hígado de rata. Luciana Almada, Angel Scandizzi, Edgardo Guibert y Joaquín Rodríguez.

Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Email: jcravero@infovia.com.ar

Se considera que el Pi biliar es un marcador de daño hepatobiliar (Moslen M. Anal. Biochem. 168:405,1988). Por esta razón se estudió el efecto que la isquemia fría produce sobre la función hepática de hígados de ratas Wistar, preservados en sol. de la Universidad de Wisconsin (UW) durante 24 y 48 horas a 4 °C y luego reperfundidos durante 1 hora en un sistema aislado con sol. Krebs-Henseleit/Albúm. Bov. 2 %. Se determinó la resistencia portal intrahepática (**Ri**), la liberación de **LDH** y **K⁺** al perfusato, el flujo biliar (**FB**) (ul/min/g.hig) y las conc. de **Pi** en bilis y perfusato. Los resultados mostraron diferencias significativas para 48 hs de preservación en las variables **Ri**, **LDH** y **K⁺**. Se encontraron además disminuciones del **FB** (control: 0.98±0.24, n=6; UW24hs: 0.77±0.24, n=5; UW48hs: 0.40±0.17*, n=6, *P<0.05) e incremento de las conc. biliares de **Pi** y de la relación **[Pi]bilis / [Pi]perfusato** (control: 0.118 ±0.033, n=24; UW24hs: 0.210±0.074*, n=16; UW48hs: 0.247±0.077*, n=19, *P<0.05). La excreción biliar acumulativa de **Pi** no mostró diferencias para los tres grupos. Estos resultados indican que, asociados al tiempo de preservación hipotérmica se manifiestan alteraciones tanto en la respuesta vascular como en la producción de la bilis. Particularmente, el manejo del **Pi** biliar indicaría posibles alteraciones de la vía paracelular en el mecanismo de formación de bilis.

311. Expresión del gen mdr en modelos de lesión hepática. Carolina Ghanem, Cecilia Ghisolfi, Abraham Lemberg, Paula Gómez, Laura Bengochea.

Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Lbengo@ffyb.uba.ar

Introducción: La P-glicoproteína (P-gp) es una proteína de membrana, ubicada en el polo sinusoidal del hepatocito. Su función es la de excreción de sustancias (fármacos, fosfolípidos, etc.), según su isoforma. En el roedor está codificada por tres genes; el mdr1a y mdr1b (asociados a la resistencia de drogas) y el mdr2 (no asociado a la resistencia de drogas). El objetivo de este trabajo es evaluar la expresión de los genes mdr1b y mdr2 en modelos de hepatopatías. Materiales y Métodos: Se trabajó con ratas Wistar macho de 200-250 gr que se dividieron en grupos. G1: colestasis quirúrgica de 8 días de evolución, G2: intoxicación con paracetamol (1 g/kg peso), inyección intraperitoneal, G3: Colestasis quirúrgica de ocho días con inyección de APAP al día siete de realizada la cirugía; G4: sham con inyección del vehículo. Se realizó la detección de la expresión de los genes mdr1b y mdr2, mediante la técnica de Northern blot. Resultados: Comparados con los controles, los tres grupos estudiados presentaron aumento en la expresión del gen mdr1b. En cambio no se detectaron modificaciones del gen mdr2 Conclusiones: Sugerimos que la colestasis y la intoxicación con APAP producen aumento en la expresión del gen mdr1b, en el primer caso inducido por sustancias de la bilis, en el segundo caso inducido por mediador/ es locales.

312. Comparación de la barrera hematoencefálica en 2 áreas del hipocampo de ratas hipertensas portales.

Scorticati Camila, Grinspon Diana, Ruibal Andrea, Iacono Ruben, Lemberg Abraham, Perazzo Juan.

Cátedras de Fisiopatología, Biología Celular, Inmunología. FFyB, UBA. e-mail: jperazzo@ffyb.uba.ar

Introducción: En trabajos previos describimos astrocitosis y angiogénesis de las áreas CA4 y CA1 del hipocampo de ratas hipertensas portales prehepáticas (HPP). Se ha descrito distinta función para éstas dos áreas por lo que se decidió evaluar astrocitos (**A**) y capilares (**C**) en CA4 y CA1. Material y Método: Ratas Wistar macho divididas en: Grupo (G) I (n=7) HPP por estrechez de vena porta, GII (n=4) Sham, GIII (n=6) controles. A los 14 días se sacrificaron extrayéndoseles el cerebro. Se midió en CA4 y CA1 la expresión del factor von Willebrand de las células endoteliales y de la proteína glial fibrilar ácida de **A** por inmunohistoquímica, anticuerpos monoclonales-avidina-biotina. Resultados: por análisis de imágenes se promediaron los resultados de GII y GIII para establecer la variación en ratas HPP. En el área CA4 no hubo variaciones en el área reactiva/**C** (AR/**C**) ni en la cantidad de antígeno/**C** (Ag/**C**). Sí hubo en CA1: AR/**C**, GII+GIII* 489 ± 21 G1: 580 ± 25; y Ag/**C**: GII+GIII*: 32 ± 1.7, G1: 42 ± 2.2; (GII+GIII* vs G1 p< 0.001). El área capilar/campo (AC/**C**) en CA4 aumentó el 37% y el 82% en CA1 y el antígeno capilar aumentó el 39% en CA1 y 104% en CA4. Conclusiones: Estos cambios permiten concluir que En la HPP la astrocitosis es similar en CA1 y CA4 y los capilares aumentan de tamaño significativamente sólo en CA1 y en número en ambas áreas.

313. Protein quinasa A (PKA) modula el tráfico intracelular de aquaporina-1 (AQP1) en colangiocitos. Sergio Gradilone, Elena Ochoa, Pamela Tietz, Nicholas LaRusso, Raúl Marinelli.

Instituto de Fisiología Experimental-CONICET, Universidad Nacional de Rosario y Center for Basic Research in Digestive Diseases, Mayo Clinic, EE.UU. e-mail: rmarinel@sede.unr.edu.ar

La secretina (vía AMP_c) induce la redistribución del canal de agua AQP1 desde un pool de vesículas intracelulares hasta la membrana plasmática del colangiocito (JBC 272:12984, 1997). En este trabajo estudiamos si PKA participa en los mecanismos reguladores de dicho proceso. Colangiocitos aislados de ratas Wistar adultas (pureza 80%) fueron tratados con el activador de PKA, DBAMP_c (200 μ M, 10 min). Por fraccionamiento subcelular se prepararon membranas plasmáticas e intracelulares y se analizó AQP1 por inmunoblotting. Células tratadas con DBAMP_c presentaron disminución intracelular (-57% $p < 0.05$, $n:3$) y aumento en membrana plasmática (+120% $p < 0.05$, $n:3$) de AQP1. Similares resultados fueron observados con otro activador de PKA, forskolin (50 μ M, 10 min). Estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal confirmaron la redistribución de AQP1, desde vesículas intracelulares hasta la membrana plasmática, inducida por los activadores de PKA. Los inhibidores de PKA, H-89 (30 μ M, 30 min) y PKI (10 μ M, 30 min), inhibieron 100% y 70%, respectivamente, la redistribución subcelular de AQP1 inducida por los activadores de PKA. **Conclusión:** Los resultados sugieren que PKA cumple un rol clave en la regulación del tráfico intracelular de AQP1 en el colangiocito.

ONCOLOGIA V

- 314. Identificación fenotípica de células dendríticas en ganglios linfáticos regionales de pacientes con cáncer.** Di Girolamo Wanda, Coronato Silvia, Spinelli Osvaldo, Portiansky Enrique y Laguens Graciela.

Cátedra de Patología B. Facultad de C. Médicas de La Plata. UNLP. e-mail: glaguens@infovia.com.ar

Numerosos estudios han demostrado que la mayoría de los tumores malignos humanos presentan un infiltrado de Células Dendríticas (CD) intratumorales y en el tejido intersticial adyacente, con fenotipo S100+ y CD1a+ o CD1a-. Estas células captan antígenos tumorales y migran a los ganglios linfáticos regionales (GLR) donde maduran y son capaces de presentarlos a los linfocitos T específicos. El objetivo de nuestro trabajo, fue determinar si los GLR sin metástasis que drenan tumores malignos humanos presentaban CD con el mismo fenotipo y densidad que los ganglios provenientes de pacientes sin patología neoplásica. Para ello efectuamos IHQ con Ac anti-S100 y CD1a sobre GRL sin metástasis de pacientes con diferentes tipos de tumores malignos ($n=23$) y sobre ganglios controles ($n=12$). Por medio del análisis estadístico se observó que los ganglios de pacientes con cáncer presentan depleción significativa de CD respecto a los controles ($p < 0,01$). En estos últimos el número de CD inmaduras (S100+ CD1a+) es superior al de CD maduras (S100+ CD1a-). Por el contrario, en los GLR sin metástasis de pacientes con cáncer esta relación se invierte con un marcado predominio de CD maduras. Nuestros hallazgos sugieren que los GLR son incapaces de desarrollar una respuesta inmune antitumoral eficaz pese a que el fenotipo de las CD corresponde a células maduras. Esta deficiencia puede deberse a factores producidos por las células tumorales que actuarían disminuyendo el número de CD y la funcionalidad de las mismas. La modulación de dichos factores conduciría a obtener un respuesta inmune antitumoral eficaz. **Palabras claves:** células dendríticas- S100 - CD1a - tumores

- 315. Modulación de la actividad citotóxica de macrófagos peritoneales (M ϕ) contra células tumorales LM3.** Inés Piccardo, Lilia Davel, María Elena Sales, Eugenia S. de Lustig, M. Adela Jasnig.

Instituto de Oncología A.H.Roffo, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. (inmuroff@fmed.uba.ar)

Los M ϕ activados liberan factores que pueden producir la lisis de células tumorales. Estudiamos la modulación de la

actividad citotóxica de M ϕ peritoneales contra células tumorales LM3 (derivadas de un adenocarcinoma mamario murino) por medio condicionado (MC) de células LM3, L-NAME e indometacina, concomitantemente con la producción de óxido nítrico (NO). Las células LM3 fueron cocultivadas con M ϕ estimulados con LPS e IFN- γ pretratados con: a) MC a distintas concentraciones; b) L-NAME 2 mM (inhibidor de óxido nítrico sintasa); c) Indometacina 10⁻⁶ M (inhibidor no selectivo de ciclooxigenasa (COX)). A las 24 hs se evaluó citotoxicidad de las células LM3 por MTS y producción de NO por reactivo de Griess. Observamos: a) Disminución en los niveles de nitritos (NO₂⁻) por el MC en forma dosis dependiente siendo significativa a partir de una concentración del 25% (sin MC: 33 μ M NO₂⁻; con MC: 14 μ M NO₂⁻; $p < 0.001$), paralelamente a una disminución de la citotoxicidad en relación efectora:target 100:1 y 50:1 (sin MC: 95%, con MC: 46%; sin MC: 61%, con MC: 13%; respectivamente). b) El L-NAME disminuyó en 69% ($p < 0.001$) la producción de NO₂⁻ concomitantemente con una inhibición de la citotoxicidad del 78% ($p < 0.001$). c) La indometacina disminuyó en 63% ($p < 0.001$) la citotoxicidad sin modificar los niveles de NO₂⁻. Concluimos que el potencial citotóxico de los M ϕ está inhibido por factores solubles liberados por las células tumorales a través de una disminución de la producción de NO y a través de productos de la COX no relacionados con los niveles de NO.

- 316. Efecto de medios condicionados de adipocitos y células tumorales LM3 sobre la migración y proliferación de células epiteliales mamarias normales de ratón.** Carla Molinari, Gabriela Rozenberg, Marcela Sandoval, Gabriel Bertolesi, Juan Calvo.

Instituto de Biología y Medicina Experimental y Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. (jcalvo@dna.uba.ar)

Las células en un organismo interactúan con su medio ambiente. Estudiamos una línea epitelial mamaria normal de ratón, evaluando migración y proliferación en ambientes donde podría encontrarse (tejido adiposo, tumor mamario). Células NMMG se cultivaron en DMEM con 10% SFB e insulina (10 μ g/ml). Para migración se realizó una herida en un cultivo confluyente y se analizó el área descubierta (expresada en unidades arbitrarias respecto de un rectángulo fijo), en presencia de medios condicionados de adipocitos 3T3-L1 y línea tumoral LM3. Los medios condicionados de LM3 y 3T3-L1 se obtuvieron de cultivos a 80% de confluencia, luego de 48h en ausencia de suero para LM3 y en 7% SFB para 3T3-L1 (antes o después de diferenciar a adipocitos). La proliferación se determinó con timidina tritiada. Los medios de LM3 y de adipocitos fueron los más potentes inhibidores de la migración de NMMG, llevando el área descubierta de 0,131 \pm 0,03 (control) a 0,354 \pm 0,089 (LM3) y a 0,193 \pm 0,053 (3T3-L1 diferenciadas). Las 3T3-L1 no diferenciadas no inhibieron la migración (0,314 \pm 0,062). Analizando la proliferación de NMMG, el medio de LM3 resultó el más inhibitorio de los medios. Las células tumorales, así como los adipocitos, liberarían factores regulatorios de migración y/o proliferación de células epiteliales mamarias normales, tal vez involucrados en el desarrollo tumoral y/o la organogénesis normal de la glándula mamaria.

- 317. Papel de heparanasas en la adhesión y migración de células epiteliales mamarias normales y tumorales de ratón.** Gabriela Rozenberg, Gabriel Bertolesi, Juan Calvo.

Instituto de Biología y Medicina Experimental y Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. (jcalvo@dna.uba.ar)

La organogénesis mamaria como la invasión de un tumor al ambiente circundante, requieren de una remodelación de la matriz extracelular. En parte esto lo cumplen las heparanasas.

Estudiamos la presencia y papel de heparanasas en la adhesión y migración de células epiteliales mamarias normales y tumorales de ratón, en relación con un medio ambiente de fibroblastos y adipocitos. La adhesión de células NMMG (normales) y LM3 (tumorales) se estudió marcándolas, a 70-80% de confluencia, con timidina tritiada y, luego de tripsinizadas, colocándolas sobre cultivos confluentes de 3T3-L1, adipocitos y los mismos tratados con heparanasas (HI), (HII) o (HIII). Las células adheridas se levantaron con clorhidrato de guanidina 4M, midiendo la radiactividad. Para migración se realizó una herida en un cultivo confluyente de NMMG y se analizó el cubrimiento del área, en presencia de HI, HII y HIII. HII y HIII disminuyeron la migración de las NMMG ($65,95 \pm 4,15$, control; $75,40 \pm 6,41$, HI; $30,13 \pm 23,75$, HII; $48,73 \pm 14,65$, HIII, $n=3$, en unidades arbitrarias). HIII redujo el número de células adheridas (NMMG o LM3) a células 3T3-L1. El análisis de actividad de heparanasas, detectando la degradación de heparina en geles de poliacrilamida, teñidos con Rubipy, mostró una alta actividad en 3T3-L1, adipocitos, NMMG y LM3, en orden decreciente. La heparanasa III (específica para heparán sulfato) tendría un papel en los procesos relacionados con la remodelación de la glándula mamaria o la invasividad tumoral.

318. Efecto citotóxico del Ácido δ -aminolevulinico sobre líneas celulares de hepatocarcinoma. De Siervi A; Rezaval C; Rossetti MV; Vazquez ES & Battle A

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) FCEyN-UBA.
e-mail: rossetti@qb.fcen.uba.ar

La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) es un desorden genético del metabolismo del hemo caracterizado por niveles aumentados de ácido δ -aminolevulinico (ALA) y porfobilinógeno (PBG), que se acumulan en tejidos. El ALA produce especies reactivas de oxígeno que causan daño oxidativo a proteínas, estructuras subcelulares y ADN. Muchos agentes que generan estrés oxidativo pueden inducir apoptosis. Se estudió el efecto del ALA sobre dos líneas de hepatocarcinoma celular: HEP G2 y HEP 3B. Ambas líneas fueron tratadas con ALA entre 0,5 y 5 mM y se analizó la viabilidad por el ensayo de MTT. El ALA resultó ser tóxico en ambas líneas celulares. En HEP G2, hubo un 30% de inhibición del crecimiento con 0,5 mM de ALA durante 24h, obteniéndose una máxima citotoxicidad (70%) con 5 mM de ALA. La línea HEP 3B fue más resistente al ALA que HEP G2 produciendo una inhibición del crecimiento del 12% con 0,5 mM de ALA durante 24h y una inhibición del 40% con la concentración más alta (5 mM). Este efecto citotóxico en HEP G2 puede ser disminuido por Hemina o D-glucosa. Sin embargo, en HEP 3B ambos agentes aumentaron el efecto citotóxico del ALA. Además, se evaluó la fragmentación del ADN y se observó el patrón característico de fragmentos nucleosomales en células tratadas con ALA. En conclusión, estos resultados muestran que el ALA es citotóxico y puede inducir apoptosis.

319. Prevalencia de hábitos tabáquicos en las mujeres de Concordia, Argentina. Elena Matos¹, Dora Loria¹, Lily Herrera², Miguel Prince², Gustavo Amestoy³, Nubia Muñoz⁴, Rolando Herrero⁴.

¹Instituto de Oncología A.H.Roffo, UBA, ²Hospital Felipe Heras, Concordia, Entre Ríos, ³CEMIC, ⁴IARC, Lyon, Francia. e-mail: matos@fmed.uba.ar

Según el Registro Poblacional de Tumores de Concordia, Entre Ríos, la incidencia de cáncer de pulmón en mujeres fue de 8,1/100,000/año(1990-94). Se analizaron hábitos tabáquicos, identificando el patrón de fumadoras según variables demográficas, reproductivas, menstruales y sexuales, en el contexto del estudio internacional sobre prevalencia de virus HPV coordinado por la IARC. Se utilizó una sub-muestra de 1786 hogares estratificada por nivel socio-económico. Las mujeres mayores de 14 años fueron invitadas y citadas perso-

nalmente al hospital regional para realizar una entrevista, examen ginecológico, colposcopia y Pap. Se requirió información sobre tipo de tabaco, cigarrillos por día y uso de filtro por cada cambio en consumo a lo largo de la vida. Se encuestaron 1028 mujeres (70% de las citadas). 24% eran fumadoras actuales y 13% exfumadoras. 15% de las fumadoras fumaban 20 o más cigarrillos por día. El tipo de tabaco era predominantemente rubio, con filtro. La mediana de edad a la iniciación del hábito aumentó con la edad. Las variables predictoras del hábito de fumar, en un modelo multivariado, fueron edad (OR=2,8, 95%IC 1,7-4,7 para 35-44 años), estado civil (OR=1,7 95% IC 1,1-2,7 para solteras) y el número de parejas sexuales (OR=3,3, 95%IC 2,0-5,6 para 4 o más). Esto indica que debe extremarse la prevención en dichas mujeres

320. Efecto antiproliferativo y pro-apoptótico de flavonas 5,6,7-trisustituidas sobre una línea celular resistente a multidroga. Mariana Beviacqua*, Alicia Pomilio**, Juan Calvo*.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental y Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (jcalvo@dna.uba.ar). **PROPLAME-CONICET, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires e-mail: proplame@qo.fcen.uba.ar).

Ciertos flavonoides inhiben la expresión de oncogenes y poseen efecto antiproliferativo. En nuestro laboratorio verificamos la actividad antitumoral de extractos de *Gomphrena spp.* Estudiamos la acción de extractos de *Gomphrena martiana* y *boliviana*, in vitro, sobre el crecimiento y supervivencia de la línea tumoral HCT-15, de adenocarcinoma de colon y resistente a multidrogas. Quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona) (Flavo A) y Flavona (Flavo B), se disolvieron en Tween-20 al 0,2% y una mezcla 90:10 de 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona y 3,6-dimetoxi-5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona (Flavo C) en propilenglicol. Evaluamos la quimiosensibilidad con timidina tritiada y colorimétricamente con MTT. La actividad pro-apoptótica se determinó por citofluorometría (yoduro de propidio). Como control se utilizó la línea preadipocítica 3T3-L1. Flavo A y B no inhibieron la proliferación celular, siendo protectores sobre la misma toxicidad del solvente. De una curva dosis-inhibición para Flavo C, la incorporación de timidina a 10 ug/ml, expresada como porcentaje \pm ES% fue del $81,6 \pm 14,4$ para HCT-15 y de $6,8 \pm 8$ para 3T3-L1, mientras que con MTT las diferencias fueron menores ($51,0 \pm 1,0$ vs $32,0 \pm 4,3$, respectivamente). La citofluorometría indicaría inducción de apoptosis en HCT-15 a 15 ug/ml y no en 3T3-L1. Flavo C presentaría un efecto marcadamente antiproliferativo en células tumorales HCT-15 e induciría apoptosis en la misma línea.

321. Desbalance alélico de 18q en cáncer de próstata.

Gustavo Leirós, Ramiro Diz, Javier Mendizábal, Carolina Sofer-Podestá, Mario Sember, Steffen Hollmer, Kumiko Eiguchi, Elisabeth Schwarz.

Cátedra de Bioquímica e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador, Argentina. Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Alemania. (keiguchi@intramed.net.ar)

Introducción: La inactivación de genes supresores de tumor (TSG) ocurre en la carcinogénesis de distintos tumores. El frecuente desbalance alélico observado en 18q12-q21, indicaría la existencia en esta región de al menos 1 TSG involucrado y datos previos sugieren una correlación entre los distintos estadios de evolución del tumor y la acumulación de defectos genéticos. **Objetivos:** Estudiar el desbalance alélico en 18q en adenocarcinomas de próstata a través de la secuencia de DNA microsatélite D18S56. **Métodos:** Muestras de adenocarcinomas de próstata y sangre periférica fueron obtenidas a partir de cada paciente (n=8). El estudio

de balance alélico fue realizado mediante PCR de la secuencia microsatélite D18S56 y la electroforesis de los productos obtenidos en poliacrilamida desnaturalizante al 6% y tinción argéntica. **Resultados:** De los 7 pacientes heterocigotas, 3 presentaron pérdida de 1 alelo (LOH) en la muestra de carcinoma, 1 mostró la presencia de nuevos alelos en el tumor (inestabilidad genética), y los 3 restantes no mostraron alteraciones. **Conclusiones:** Si bien la cantidad de pacientes estudiados es baja, los resultados obtenidos mostrarían un desbalance alélico en 18q11-q12 y la existencia de posibles TSG en esta región que justifican continuar el estudio con otros microsatélites en 18q11-q21, con el objeto de definir marcadores de carcinogénesis y evolución de los tumores.

322. Estudio de factibilidad de un nuevo método para autorradiografía en BNCT. Marcelo Ruffolo¹, Alejandro Pérez de la Hoz¹, Gisela Saint Martin², Gustavo Santa Cruz³, Omar Bernaola².

¹Universidad Nacional de General San Martín. ²Comisión Nacional de Energía Atómica. ³Harvard Institute of Medicine.USA. e-mail: bernaola@cnea.gov.ar

A fin de obtener la distribución espacial de ¹⁰Boro en un tejido se propone un dispositivo novedoso para el montaje y análisis de muestras, sin separación del conjunto detector-tejido, en el proceso de irradiación con neutrones y revelado químico de las trazas nucleares de partículas alfa y ⁷Li que fueron generadas, para la autorradiografía en BNCT (Boron Neutron Capture Therapy). La información obtenida permite la realización del cálculo micro-dosimétrico. El dispositivo consiste en una capa de Makrofol-E (0.8±0.1µm) y una capa de Acetato de PVC (0.4±0.1µm) como detector y protector del tejido respectivamente, generadas en el laboratorio, montadas entre dos anillos de Teflon para la fijación y el manipuleo del conjunto detector - protección -tejido (diámetro interno 2.4 cm, diámetro externo 7.1 cm), y sellado el conjunto mediante resinas de siliconas. La visualización de las trazas en el detector se ve favorecida por la utilización de fluoresceína sódica entre el detector y el portaobjeto en microscopía de fluorescencia. El dispositivo permitió el cultivo y tinte de las muestras analizadas sin necesidad de desmontarlas del detector, facilitándose la correlación espacial entre la morfología celular y las trazas analizadas, obteniéndose un límite de resolución espacial final de 1 a 2 µm. En muestras preliminares irradiadas con una fuente de ²⁴¹Am y procesadas químicamente fue posible la visualización de las trazas y la caracterización del detector.

323. Efecto radiosensibilizador del óxido nítrico en células tumorales con distinto grado de malignidad. Lucía Policastro¹, Hebe Durán^{1,2}, Beatriz Molinari¹, Yann Henry³, Andrés Kreiner^{1,2}, Alejandro Maza³, Vanesa Negri², Vincent Favaudon³.

¹Comisión Nacional de Energía Atómica, Departamento de Radiobiología, Argentina. ²Universidad Nacional de General San Martín, Escuela de Ciencia y Tecnología, Argentina. ³Instituto Curie, Francia. e-mail: policast@cnea.gov.ar

El objetivo de este trabajo es estudiar la radiosensibilidad de células tumorales con diferente grado de malignidad y evaluar el efecto radiosensibilizador del óxido nítrico (NO) *in vitro* e *in vivo*. Se utilizaron las líneas celulares PB y CH72T4 de ratones SENCAR, y PDV y PDVC57 de ratones C57BL/6N, siendo en ambos casos la segunda más maligna que la primera. Las células fueron irradiadas con una fuente de ¹³⁷Cs (0.9 Gy/min, dosis = 0-8 Gy). Para evaluar la radiosensibilización las células fueron preincubadas con un dador de NO (DETA 0.3-2 mM). Las curvas de sobrevivencia se ajustaron al modelo lineal-cuadrático ($S=e^{-aD-bD^2}$). Los parámetros obtenidos mostraron mayor radiorresistencia en las células más malignas (CH72T4: a=0.07, b=0.023 y PB: a=0.18 y b=0.021) y (PDVC57: a=0.05, b=0.015 y PDV: a=0.15, b=0.0018). Las células más malignas mostraron una mayor radiosensibilización con NO ($D_{\text{DETA } 1\text{mm}} /$

$D_{\text{sin DETA}}$ para 80 % de sobrevivencia: CH72T4:10.5; PB:1.37 y PDVC57:2.6; PDV:1.8). Se demostró la radiosensibilización por NO *in vivo* en tumores inducidos por células CH72-T4, tratados con un dador de NO e irradiados con 5 ó 10 Gy. La inhibición del crecimiento tumoral a los 30 días fue del 85 % con 10 Gy y de 98.5 % con 10 Gy + dador de NO. Estos resultados permiten evaluar la posible utilización de dadores de NO en protocolos de radioterapia.

NEUROCIENCIAS II

324. Allopregnenolona *in vivo* modifica los niveles de NGF y BDNF en cuerpo estriado de ratas alcoholizadas prenatalmente. Cecilia Estrella¹, Jenny Fiedler², Hernán Lara² y Ricardo Cabrera¹.

¹Laboratorio de Investigaciones Neuroquímicas, Comportamentales y Endócrinas. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Laboratorio de Neurobioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Chile. Santiago de Chile. Chile. estrella@lab.cricyt.edu.ar

Las neurotrofinas NGF y BDNF son secretadas en cuerpo estriado de rata por neuronas corticales y estriatales. Sus receptores pueden ubicarse en neuronas GABAérgicas o glutamatérgicas, sobre las cuales allopregnenolona (All) ejerce su acción uniéndose al receptor GABA_A. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de All *in vivo* sobre los niveles de NGF y BDNF de ratas alcoholizadas prenatalmente (ALC). Se utilizaron crías macho alcoholizadas prenatalmente con etanol (2.9g/kg) en el día E8. Postnatalmente en el día 21 se le inyectó a un grupo la misma dosis de etanol, a otro grupo All (2µg/50g) sc (tratamiento agudo), y a otro grupo la misma dosis de All desde el día 10 al 21 (tratamiento crónico). Se determinaron los niveles de NGF y BDNF de Cuerpo Estriado (CE) y Sustancia Nigra (SN) por el método de ELISA. Los datos se analizaron por test de *t*. En CE se observó que la alcoholización prenatal aumentó los niveles de BDNF ($p<0.05$). La estimulación en P21 con etanol no produjo variaciones en los niveles de NGF ni de BDNF. El tratamiento agudo con All disminuyó los niveles de BDNF en ratas control ($p<0.05$), mientras que el crónico disminuyó los niveles de NGF en ratas ALC ($p<0.05$), y de BDNF en ratas control y ALC ($p<0.05$). En SN no se observaron diferencias significativas. Concluimos que All regula diferencialmente la concentración de NGF y BDNF.

325. Receptores para Benzodiacepinas (RBZ) en médula espinal lumbar (MEL) de animales con desarrollo temprano y envejecimiento. Verónica Dorfman. María Vega. Héctor Coirini*.

Laboratorio de Neurobiología-IByME / CONICET y Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Argentina. *e-mail: hcoirini@dna.uba.ar

La presencia de proyecciones GABAérgicas hipotalámicas hacia la MEL ha sido descripta. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios en RBZ en la MEL de ratas macho mediante autorradiografía cuantitativa. Ratas Sprague-Dawley fueron sacrificadas a distintas edades (10 y 21 días, y 3, 9 y 20 meses, n=5 por grupo). Secciones coronales de MEL 5-6 fueron incubadas con [³H]-Flunitrazepán 10 nM en ausencia o presencia de diazepam 5µM. El análisis de los autorradiogramas generados indicó que animales de 10 días presentan distribución homogénea del RBZ en (sg) sustancia gris (277.1±5.7 fmol/mg tejido húmedo) y valores menores en (sb) sustancia blanca (170±12 fmol/mg t.h.). Animales de 3-20 meses de edad presentan distribución heterogénea del RBZ en sg, siendo mayor en láminas II, III y X (199.6±13.5 fmol/mg t.h., ratas de 3 meses) que en asta ventral (AV) la cual presenta una reducción significativa del 42% respecto a ratas de 10 días ($p<0.05$,

ANOVA). Los valores de Kd fueron similares en las láminas II, III y X en animales adultos mientras que en AV se observó un aumento significativo progresivo con la edad (10 d: 1.33 ± 0.46 y 20 m: 2.88 ± 0.5). Estos cambios indicarían un proceso de maduración del RBZ en MEL con cambios en su localización, densidad y afinidad luego de la masculinización. La ausencia de cambios en RBZ entre animales adultos, indicaría una no correspondencia entre RBZ y el declive de la actividad sexual. (PIP 0819/98 y TM-12-UBA)

326. Efecto de Allopregnenolona sobre la neurotransmisión glutamatérgica alterada por alcoholización aguda prenatal. Cecilia Estrella, Lorena Contreras, Jorge Gonzalez, Ricardo Cabrera.

Laboratorio de Investigaciones Neuroquímicas, Comportamiento y Endócrinas. Unidad de Neuroquímica y Farmacología del Comportamiento. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. e-mail: estrella@lab.cricyt.edu.ar

Los neuroesteroides (NS) modulan el sistema GABAérgico, ejerciendo su acción sobre el receptor GABA_A, el cual posee además un sitio de acción para el etanol. En trabajos anteriores demostramos que la alcoholización aguda prenatal puede alterar las actividades GABAérgica y glutamatérgica centrales. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los posibles mecanismos de acción implicados en estas alteraciones, y analizar el efecto de la administración aguda de allopregnenolona (All) sc (2ug/50g) sobre ellas. Se determinó la liberación de ³H-Glu y ³H-GABA del cuerpo estriado (CE) por el método de superfusión de cortes aislados en ratas macho de 21 días de edad, alcoholizadas prenatalmente (2.9g/kg) (ALC) en el día E8. Los resultados se expresaron como % de liberación y se analizaron mediante test de *t*. Se observó una disminución de la liberación de ³H-Glu ($p < 0.01$), y un aumento de la liberación de ³H-GABA ($p < 0.05$) inducidas por K⁺ (28mM) en ratas ALC. La presencia de AP-7 (100uM) o de CNQX (10uM) no modificó la respuesta. All *in vivo* inhibió la liberación de ³H-Glu en ratas control ($p < 0.05$), mientras que potenció la respuesta en ratas ALC ($p < 0.05$). Concluimos que la alcoholización aguda prenatal induce una hipofunción del sistema glutamatérgico, donde All actuaría modulando positivamente la liberación de ácido glutámico en el CE.

327. Efecto analgésico mediado por la activación de los receptores dopaminérgicos D2 del estriado. Juan Belforte, Bernadette Saunier Rebori, Jorge Pazo.

Laboratorio de Neurofisiología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. (jpazo@fmed.uba.ar).

Trabajos previos de este laboratorio demostraron que la estimulación eléctrica o química de ciertos sitios del estriado en la rata inhibe el reflejo nociceptivo de abertura bucal (RNAB). El objetivo del presente trabajo fue analizar la participación de los receptores dopaminérgicos estriatales en ese efecto analgésico. En ratas anestesiadas con uretano (1,2 g/kg, i.p.), se estimuló la pulpa dental con electrodos introducidos en los incisivos inferiores y se registró el reflejo mediante electrodos en el vientre anterior del dígitro. Se realizó una curva dosis respuesta microinyectando apomorfina (agonista D1-D2) en el estriado (0, 3, 10, 30 nmol/0,5ul) observándose una inhibición significativa en la amplitud del RNAB con 10 y 30 nmol respecto al control ($44,1 \pm 10,5$ % y $73,6 \pm 9,9$ %; Newman-Keuls $p < 0,005$, $n=11$). Resultados similares se obtuvieron con un agonista D2 (quinpirol 10, 30 nmol/0,5ul; $59,8 \pm 12,7$ % y $89,7 \pm 8,7$ %; N-K $p < 0,001$). La microinyección de un agonista D1 (SKF 38393 17nmol/0,5ul) no produjo ningún efecto significativo. Lo mismo ocurre con el haloperidol (7 nmol/0,5ul). El efecto del quinpirol fue parcialmente revertido por una inyección i.v. de naloxona (0,2 mg/kg). De lo anterior concluimos que la estimulación de los receptores dopaminérgicos D2

estriatales tiene un efecto analgésico parcialmente dependiente del sistema opioide.

328. Endotelina 1 y 3 (ET 1 y 3): Acciones sobre la captación de noradrenalina (NA). Sandra Hope, María Choren, Natalia Riesco Murua, Liliana Bianciotti, Marcelo Vatta.

Cátedras de Fisiología y Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. (mvatta@ffyb.uba.ar)

La presencia de mRNA y receptores de las ETs en neuronas catecolaminérgicas hipotalámicas nos llevaron a estudiar la posible interacción entre la transmisión noradrenérgica y las ET 1 y 3. El objetivo del presente trabajo fue investigar los posibles efectos de las ETs sobre la captación de la NA. Los experimentos se realizaron en ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 250 a 300 g de peso. Los hipotálamos se incubaron *in vitro* con 3H-NA según Vatta y col. (Regul. Pept. 65,175,1996). Los datos se expresan como cpm/ug de proteína \pm SEM. $p < 0.05$ vs control (C) (ANOVA y Test de Tukey). Los resultados iniciales realizados en hipotálamo entero mostraron que ambas ETs no presentaban efectos definidos sobre la captación de NA, por lo tanto realizamos los estudios en diferentes regiones hipotalámicas. Los experimentos mostraron lo siguiente: hipotálamo anterior, C₍₁₂₎ 22 ± 1 vs ET110nM₍₆₎ $15 \pm 1^*$ y ET3 10nM₍₈₎ 24 ± 1 ; hipotálamo medio, C₍₁₂₎ 13 ± 1 vs ET1 $22 \pm 1^*$ y ET3₍₆₎ $9 \pm 1^*$; hipotálamo posterior, C₍₁₂₎ 31 ± 2 vs ET1₍₈₎ $20 \pm 2^*$ y ET3₍₆₎ $23 \pm 1^*$. Por otra parte, se determinó que los efectos producidos por las ETs sobre la captación de NA eran a expensas de la captación neuronal sin afectarse claramente la captación extraneuronal. Estos resultados permiten concluir que tanto la ET1 como la ET3 modifican de diferente manera la captación neuronal de NA en las diferentes regiones hipotalámicas estudiadas, comportándose como neuropéptidos moduladores de la transmisión noradrenérgica.

329. Activación paralela de neuronas glutamatérgicas del núcleo accumbens y el hipocampo ventral: Efectos en la exploración inducida por la novedad. Edgardo O. Alvarez,

Unidad de Neuroquímica y Farmacología del Comportamiento, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. (ealvarez@fmed2.uncu.edu.ar)

Se ha descrito anteriormente que la activación glutamatérgica simultánea del accumbens y el hipocampo modifica la respuesta exploratoria en un ambiente conflictivo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si en otros ambientes neutros donde predomina la novedad, la estimulación química con ácido glutámico (MSG) afecta la exploración. Se trabajó con ratas adultas, implantadas simultáneamente en el accumbens y en el hipocampo con cánulas de microinyección. 72 h después diversos grupos se microinyectaron con 1 ul de salina en el accumbens y en el hipocampo ($n=14$); salina en el hipocampo y 10 nmol de MSG en el accumbens ($n=8$); salina en el accumbens y MSG en el hipocampo ($n=13$) o MSG en ambas estructuras ($n=13$). 5 min más tarde, los grupos se expusieron a la exploración de un hole-board enriquecido por 5 min. Los resultados mostraron que en el hipocampo MSG aumentó la actividad motora (2641.2 ± 162.4 cuentas vs 1776 ± 195.1 cuentas; MSG vs salino, $p < 0.01$), sin cambios en otras conductas. En el accumbens, MSG no afectó la locomoción pero inhibió la exploración subterránea (2.5 ± 0.8 veces vs 6 ± 1 veces; MSG vs salino, $p < 0.05$). En las dos estructuras, MSG no afectó la locomoción y no interfirió con la inhibición de la exploración subterránea. En conclusión: las neuronas glutamatérgicas del accumbens interactúan con las del hipocampo en la expresión de las conductas exploratorias.

330. Identificación por Resonancia Magnética de subtipos citoarquitectónicos de corteza cerebral en humanos. Mariana Bendersky^{1,2,4}, Brenda Giagante², Silvia

Oddo^{2,3}, Damián Consalvo^{2,3,4}, Walter Silva^{2,3}, Saidon Patricia², Carlos Rugilo⁴, Gustavo Schuster⁴, Salomón Muchnik^{1,3,5}, Silvia Kochen^{2,3}.

¹UBACYT ²Centro Municipal de Epilepsia, División Neurología, Hospital Ramos Mejía, Bs. As. UBA ³CONICET. ⁴Fundación FEMIEN. ⁵Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari ⁵ e mail: _mbendersky@intramed.net.ar

La Resonancia Magnética (RM) permite un estudio detallado de la macroscopía in vivo de cerebros sanos y enfermos. El objetivo de este trabajo fue identificar través de la RM las distintas cortezas desde el punto de vista citoarquitectónico. **Metodología:** En 22 personas adultas sin patología neurológica se realizaron, a través de la RM, con adquisición en modo Inversión-recuperación con atenuación de fluido (FLAIR) cortes de 5mm. en el plano coronal, perpendicular al eje mayor del hipocampo. Se midió la intensidad de la señal en 12 sectores diferentes de la corteza cerebral. Se las agrupó según la clasificación de Von Economo en : 1:Cortezas Límbicas, 2:Paralímbicas agranulares, 3:Paralímbicas granulares, 4:Neopallio parietal, 5:Neopallio frontal. Se realizó un test T para muestras pareadas, considerándose estadísticamente significativo (ES) un valor de $p < 0.05$. **Resultados:** Encontramos diferencias ES comparando los diferentes grupos, excepto entre los grupos 1 y 2. No observamos diferencias ES entre cortezas pertenecientes a un mismo grupo. **Conclusión:** Las diferencias estructurales de la corteza cerebral determinan modificaciones en la intensidad de la señal. La RM permite diferenciar subtipos citoarquitectónicos de corteza cerebral.

331. Ausencia de correlación entre la capacidad receptora GABAérgica y los niveles de lactato en un modelo de hipoxia hipóxica aguda en el SNC en desarrollo. ¹Diego Rodríguez Gil, ¹Florencia Coronel, ²Cristina Carmona, ²Gustavo Negri y ¹Sara Fiszler de Plazas.

¹Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ²Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Fax: (54 11) 4788-5885.

El SNC expuesto a condiciones de hipoxia presenta alteraciones que van desde cambios en la neurotransmisión hasta muerte celular. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las posibles alteraciones en la neurotransmisión inhibitoria luego de un trauma hipóxico (O_2 al 8%, 60 min.) en el lóbulo óptico (LO) en desarrollo. Los ensayos de saturación de [³H]GABA se realizaron en una fracción de membranas sinápticas aisladas a partir de LO de pollo en diferentes días embrionarios (DE). Los niveles de lactato se determinaron en homogenatos de LO. Los ensayos de saturación mostraron que en el DE 12 la injuria produce una reducción en el número máximo de sitios de unión (B_{max}) de GABA en el receptor $GABA_A$, sin alterar la constante de disociación (K_d). Los estudios realizados en los DE 17 y 18 (donde existen dos sitios de unión de GABA), mostraron que los valores de K_d y B_{max} de ambos sitios, no se encuentran alterados luego de la injuria. Se sabe que en los últimos días de desarrollo, el embrión se encuentra en un estado de hipoxia fisiológica, con lo cual podría estar adaptado y no censar la injuria externa producida. A tal fin se determinaron los niveles de lactato como parámetro fisiológico de hipoxia, mostrando en todos los estadios de desarrollo estudiados un incremento similar. En conclusión, si bien el embrión detecta que se encuentra en un ambiente hipóxico, representado por un aumento en los niveles de lactato en todos los estadios, esto no va acompañado de una alteración en la unión de GABA a su sitio receptor en estadios tempranos del desarrollo.

332. Cambios en la expresión de IGF-1 en médula espinal de ratas tratadas con monosodio glutamato (MSG). Verónica Dorfman, María Vega, Héctor Coirini*.

Laboratorio de Neurobiología-IBYME / CONICET y Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medi-

cina, Universidad de Buenos Aires. Argentina. *e-mail: hcoirini@dna.uba.ar

La presencia de ARNm para el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) y para su receptor ha sido descripta en la médula espinal lumbar. El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de este factor en la región lumbar 5-6, donde se localizan los núcleos motores involucrados en erección peneana que se ven alterados por tratamiento con MSG. Ratas macho Sprague-Dawley fueron inyectadas sc con una dosis de 4mg MSG/g de peso corporal, los días pares 2 a 10 postnatal. El grupo control fue inyectado con solución salina C1Na 10% (n=7 por grupo). A los 4 meses fueron sacrificados por perfusión con solución salina 0,9% y buffer fosfato paraformaldehído 4%. El estudio de secciones coronales con un anticuerpo policlonal para IGF-1 en dilución 1/750, mostró marcación específica sobre células en láminas IV y V y sobre fibras en la región dorsomedial (DM). Se observó una reducción significativa ($p < 0.001$) del 40% del área celular de láminas IV y V en ratas MSG, acompañada por un aumento del número de células menores a $200\mu m^2$. La región DM presentó reducción del 48% del área fibrosa respecto al control. Ninguna región presentó diferencias de densidad de IGF-1 entre MSG y controles. La disminución del área neuronal y fibrosa, pero no de su densidad, sugiere que las ratas MSG presentarían expresión deficiente de IGF-1 en la región de los núcleos motores, lo que podría relacionarse con alteración en la respuesta muscular. (PIP 0819/98 y TM-12-UBA).

333. Las relaciones de dominancia en el lóbulo frontal. Alicia Merlo, Alfonso M Albanese, Jorge Miño, Elena Gómez, Adriana Ingratta, Tomás Mascitti, Eduardo Albanese.

Facultad de Medicina, Universidad del Salvador. Facultad de Farmacia y Bioquímica y Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. (e-mail: tamara@ssdnet.com.ar)

Introducción: La relación de dominancia (rD) que presentamos en el 25º Congreso Argentino de Neurociencias (2000) cuantifica la dominancia de grupos de estructuras bilaterales, considerando los valores relativos de asimetría, expresándola en una sola cifra, con significación estadística. Permite comparar estadísticamente niveles de dominancia de distintos grupos. **Objetivo:** Obtener la rD de peso y de superficie cortical expuesta y profunda del lóbulo frontal y de sus giros. **Material y método:** Lóbulos frontales de 12 cerebros adultos postmortem se procesaron según nuestro método (Arch.Neurol. 46: 307-310; 1989) a fin de obtener sus lateralidades de peso y superficie cortical expuesta y profunda para calcular las rD, basadas en la correlación no paramétrica de Spearman (rango entre -1 y +1) donde ambas variables que correlacionan son valores de la lateralidad (con su signo y absoluto). El signo resulta negativo si la dominancia es izquierda y positivo si es derecha. **Resultados:** Son significativas para peso y superficie las rD de los giros cinguli (0.95 y 0.97; $p < 0.01$), superior + medio (-0.62 y -0.74; $p < 0.05$) e inferior (-0.60 y -0.60; $p < 0.05$). **Conclusión:** Las rD cuantifican la lateralidad izquierda que observamos en el giro inferior (Arch.Neurol. 46: 307-310; 1989) y derecha en el cinguli (Biol.Psychiatry 38: 13-21; 1995). El giro precentral, la regio orbitalis y el lóbulo carecen de dominancia. Los giros superior+medio e inferior muestran similar dominancia.

334. Efectos de la Endotelina 1 y 3 (ET-1 y 3) sobre la liberación de noradrenalina (NA) y la actividad de la Tirosina Hidroxilasa (TH), en el hipotálamo de ratas normales. Andrea di Nunzio, Guillermina Legaz, Valeria Rodano, Liliana Bianciotti, Marcelo Vatta.

Cátedras de Fisiología y Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. (mvatta@ffyb.uba.ar)

En virtud a la presencia de sitios receptores para las ETs en neuronas catecolaminérgicas hipotalámicas, el objetivo del

presente trabajo fue determinar los efectos de la ET-1 y ET-3 sobre la liberación neuronal de NA y sobre la actividad de la TH en hipotálamos de ratas Sprague-Dawley macho (250-300g). Los estudios de liberación neuronal de NA se realizaron según Vatta y col. (Regul. Pept.65,175,1996) y la actividad de TH se determinó según Park y col. (Brain Res.,508,301,1990). Los resultados muestran que los efectos producidos por ambas ETs en hipotálamo total no están claramente definidos. En base a esto se estudiaron los efectos en diferentes regiones del hipotálamo: Anterior, 10 min.: C₍₁₂₎, 1.0±0.05* vs ET-1₍₇₎, 0.7±0.05* y ET-3₍₆₎, 0.9±0.05*; 15 min.: C₍₁₂₎, 0.9±0.07* vs ET-1₍₇₎, 0.6±0.06* y ET-3₍₆₎, 0.7±0.06*; Medio, sin modificaciones; Posterior, 10 min.: C₍₉₎, 0.9±0.03* vs ET-1₍₆₎, 1.3±0.04* y ET-3₍₅₎, 1.2±0.06*; 15 min.: C₍₉₎, 0.8±0.06* vs ET-1₍₆₎, 0.9±0.1* y ET-3₍₅₎, 1.3±0.1*. Con respecto a la actividad de la TH: Hip. Anterior: C, 142±26* vs ET-1, 571±24* y ET-3, 332±53*; Hip. Posterior: C, 883±139* vs ET-1, 1852±31* y ET-3, 1262±104*; Hip. medio: sin modificaciones. Los resultados se expresan como fracción liberada (E/B). *p<0.05 (ANOVA y "t" test modificado por Bonferroni). Estos resultados permiten concluir que ambas ETs se comportan como neuromoduladores de la transmisión noradrenérgica, actuando de forma opuesta en las distintas regiones hipotalámicas.

INMUNOLOGIA V

335. Inmunodeficiencias Primarias. Primer informe del Registro Argentino. Matías M Oleastro, Roberto Craviotto, Guillermina Feldman, Vera Giraudi, Néstor Pérez, Eva M Rivas, Marta E Zelazko.

*Grupo de trabajo de Inmunología de la Sociedad Argentina de Pediatría. (Fax 011 43085325)
e-mail: moleastro@garra.giga.com.ar*

Las Inmunodeficiencias Primarias (IDP) son enfermedades que resultan de uno o más defectos del sistema inmune. Con el propósito de conocer la epidemiología de estas enfermedades en nuestro medio se inició en 1994 el registro Argentino. Se utilizaron fichas para la recolección de datos y la versión 6.03 de Epi - Info para su análisis. Este primer informe reporta pacientes diagnosticados entre junio de 1984 y junio de 1999. **Resultados:** Se registraron 652 casos. El 74 % provinieron de Capital Federal y provincia de Bs. As. El diagnóstico fue establecido antes de los 18 años de edad en el 95,6 % de los casos. Las IDP más frecuentes fueron las Deficiencias predominantemente de anticuerpos: 492 casos (75 %), las que se asocian a Otros Defectos mayores: 69 casos (10 %), las asociadas a Defectos del fagocito: 41 casos (6,2 %), los Defectos del fagocito: 26 casos (3,9 %), las Deficiencias combinadas: 18 casos (2,7 %) y las Deficiencias del complemento: 6 casos (0,9 %). Dentro de las IDP predominantemente de anticuerpos la más frecuente fue la Deficiencia de IgA: 252 casos seguida por la Inmunodeficiencia Común Variable: 82 casos y la Agamaglobulinemia ligada al sexo: 68. **Conclusiones:** La comparación con registros de otros países y el conocimiento de la incidencia estimada para estas enfermedades nos permite inferir subdiagnóstico y subregistro en nuestro país.

336. Síndrome de Wiskott Aldrich (SWA). Experiencia de 13 años en un centro pediátrico. Silvia V Krasovec, Matías M Oleastro, Sergio Rosenzweig, Jorge G Rossi, Andrea R Bernasconi, Laura E Perez, Adriana E Roy, Silvia M Danielian, Jazmín L El Hakeh, Marta E Zelazko.

Servicio de Inmunología, Hospital de Pediatría «Dr. Juan P. Garrahan», Buenos Aires. (Fax (011) 43085325)

Se analizaron los datos demográficos y evolutivos de 12 niños con SWA. **Resultados:** Mediana de edad de diagnóstico: 5 meses (1-22 meses). Forma de presentación: todos tuvieron plaquetopenia, asociada a eczema (10/12) y/o infecciones (8/12) o aislada (1/12). Infecciones más frecuentes:

neumonía (82%), otitis supurada (73%) y diarrea (64%). 7 tuvieron hemorragias y 3 autoinmunidad. No hubo enfermedad maligna. Al diagnóstico se observó: recuento medio de plaquetas de 27000/mm³; elevación de IgA en 11/12 y de IgE en 10/11; no hubo disminución de IgM; isohemaglutininas bajas en 4/8; linfopenia absoluta en 4/12; proliferaciones linfocitarias bajas frente a CD3 en 7/9 y a antígenos en 3/3, normales frente a PHA en 9/9. Se confirmó el defecto molecular del gen WASP en 10 pacientes. Se realizó transplante de médula ósea alogénico en 6 casos. Mortalidad: 66%; 5 por infección y hemorragia y 3 por causas relacionadas con TMO. **Conclusiones:** 5 casos se presentaron con la tríada clásica de plaquetopenia, eczema e infecciones; lo más frecuente fue plaquetopenia y eczema. Predominaron las infecciones respiratorias. Al diagnóstico no hubo IgM baja y 4 tuvieron isohemaglutininas. La linfopenia absoluta se relacionó con mayor incidencia de infecciones virales, pero no siempre con la funcionalidad celular. La confirmación del defecto molecular es importante dada la variabilidad clínica e inmunológica. En nuestra serie el TMO tuvo alta mortalidad (50%).

337. Posible reversión espontánea de una delección puntual en linfocitos T de un paciente con inmunodeficiencia combinada severa ligada al X. Silvia M. Danielian, Matías M. Oleastro, Marta E. Zelazko, Jorge G. Rossi.

Servicio de Inmunología. Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan". (Fax: 43-08-53-25).

La inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X (SCIDX1) se caracteriza por la ausencia de linfocitos T y NK y ocurre por mutaciones en el gen que codifica para la cadena g de los receptores de IL2 (IL2Rg), 4, 7, 9 y 15, lo que explica la severidad del inmunofenotipo en SCIDX1. En este trabajo se describe un paciente cuyo diagnóstico de SCIDX1 se realiza por historia familiar, síntomas clínicos y la puesta en evidencia de una alteración genética en el gen de IL2Rg. A partir de ADN extraído de sangre periférica total y por secuenciación directa hallamos una delección puntual en el exón 3 del gen de IL2Rg. Sin embargo, el paciente presentaba un número bajo o normal de linfocitos T y respuestas proliferativas bajas a mitógenos. El análisis de microsatélites asociados al locus del gen descartó la presencia de mosaicismos del cromosoma X. Una metodología similar mostró que los linfocitos T no eran producto de un injerto materno-fetal. Se separaron células CD3+ de sangre periférica del paciente y por secuenciación se demostró la ausencia de la delección en el exón 3 del gen. Siendo que la madre mostró ser heterocigota para esta mutación, este resultado indicaría que el gen de IL2Rg sufrió una reversión somática sitio-específica durante la diferenciación temprana T. Si bien la reversión de una delección puntual es estadísticamente muy improbable la ventaja selectiva que le imprime a estas células permitiría la manifestación de este raro evento.

338. Inmunodeficiencias Combinadas. Experiencia de 13 años en un centro pediátrico. Matías M Oleastro, Jorge G Rossi, Sergio Rosenzweig, Laura E Perez, Andrea R Bernasconi, Adriana E Roy, Silvia M Danielian, Marta E Zelazko.

Servicio de Inmunología. Hospital «Dr. Juan P. Garrahan», Bs. As. (fax 43085325).

Las Inmunodeficiencias Combinadas (IDC) son enfermedades que presentan alteraciones de la inmunidad celular y humoral. Analizamos diferentes aspectos de 16 niños (12 masc, 4 fem) con IDC vistos en nuestro servicio en los últimos 13 años. **Resultados:** Tipo de IDC: IDC Severa ligada al sexo: 7 p, Deficiencia de ADA: 2 p, IDC Severa autosómica recesiva: 1 p, Deficiencia de IL-2: 1 p, Defecto de expresión de HLA clase II: 1 p. En 4 casos la causa no pudo ser determinada. La edad media a la presentación clínica fue de 2,28 meses (r 0 - 7). La edad media al diagnóstico fue de 5,4 meses (r 2 - 13). Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron:

candidiasis persistente (14 p), diarrea (13 p) y desnutrición (10 p). Nueve pacientes presentaron BCGitis, 6 de ellos diseminada. El número medio de linfocitos totales fue de 1654/uL mientras que el de linfocitos T (CD3) de 96/uL ($r = 0 - 900$). Tres casos de «probable» IDC Severa ligada al sexo fueron confirmados por mutaciones en el gen *IL 2RG*. Trece pacientes recibieron trasplante alogénico de médula ósea, 11 de ellos de donante haploidéntico. Nueve pacientes (52 %) fallecieron, la mayoría por compromiso pulmonar. **Conclusiones:** Resaltamos la candidiasis como manifestación prevalente, el retraso diagnóstico en relación a la presentación clínica, la alta incidencia de BCGitis, la linfopenia y la alta mortalidad relacionada al compromiso pulmonar.

339. IL-6 y su receptor soluble en pacientes trasplantados renales. María I. García, Andrea Racca, Adriana Soutullo, Ileana Malan Borel.

Cátedra de Inmunología Básica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral e-mail: imalanb@fbc.unl.edu.ar.

En el rechazo de injertos participarían LT CD8⁺ y ciertas citoquinas. La IL-6, liberada frente a injuria, inicia su acción al unirse al receptor de membrana gp80 (IL-6R), enviando la gp130 la señal al interior de la célula. En el presente trabajo se analizaron, por ELISA sandwich, los niveles séricos de IL-6 y de su receptor soluble (sIL-6R) en pacientes trasplantados renales que presentaban rechazo, agudo (RA)(n=12) o crónico (RC)(n=15), buena evolución (BE)(n=11) del injerto así como en individuos sanos (IS)(n=10), a fin de analizar la participación de dichas moléculas en el trasplante renal humano. No hubo diferencias significativas entre los niveles de IL-6 en RA (11,16±3.28pg/ml) y RC (14,26±2,11pg/ml)(p>0,05), valores superiores a los provenientes de pacientes con BE (3,25±1,03pg/ml)(p<0.01) y de IS (24pg/ml±0,05)(p<0.01). No se observaron diferencias significativas entre los niveles de sIL-6R en pacientes RA (44615,76±3347,72pg/ml) y RC (31545,49±5842,95pg/ml)(p>0,05) y entre RC y BE (33625,17pg/ml±3378,46pg/ml)(p>0,05), siendo éstos más elevados que el de IS (20229,01±1244,02pg/ml)(p<0.01). La elevación de los niveles séricos de IL-6 podría asociarse a un mal pronóstico del órgano trasplantado, pudiendo ser utilizado como un marcador de disfunción renal.

340. Regulación del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1R) en la proliferación de linfocitos T humanos inducida por PHA o IL-2. María E. Segretin, Adriana Galeano, Alicia Roldán, Roxana Schillaci.

Inst. Biología y Medicina Experimental, Sanat. Mater Dei (Fax 786-2564)

El IGF-1 aumenta la proliferación de linfocitos estimulados *in vitro* a través de la endocitosis de su receptor. De acuerdo a ello se relacionó el ARNm del IGF-1 con la expresión del IGF-1R 30 min después del estímulo. También se estudió la expresión del IGF-1R y el CD25 a lo largo del ciclo proliferativo, y en la reentrada en un nuevo ciclo por efecto de IL-2. Para ello, se estimularon con PHA CMSP humana, agregando IL-2 al 7° día de cultivo. La detección del ARNm se hizo por RT-PCR, y por citometría de flujo se detectó: por inmunofluorescencia el IGF-1R y CD25, y con yoduro de propidio el ciclo celular. A los 30 min se observó una disminución del ARNm del IGF-1 (45±1%) y la expresión mínima del IGF-1R (0h:33.6± 4.6; 30 min 14.3± 4.5% células IGF-1R+). El IGF-1R reapareció a las 24 h (29.0± 7.5%) recuperando los valores iniciales a las 36 h; mientras que el CD25 fue mayor en las células IGF-1R+ que en las IGF-1R- (intensidad fluorescencia a las 36 hs:174 ± 18 vs 73±17). Entre el 2° y 9° el IGF-1R se mantuvo constante, aún con el agregado de IL-2 (20.1± 5.6% células en fase S+G₂M, al 9° día). Estos resultados indicarían que la internalización del IGF-1R sólo se induce durante la salida de

la fase G₀ del ciclo celular, cuando disminuye la síntesis del IGF-1, reapareciendo en las células con mayor expresión de CD25. No se observó la regulación negativa del IGF-1R en blastos estimulados con IL-2.

341. Alteraciones tempranas en la selección positiva en el timo de los ratones mutantes nactk asociadas a una alteración en el gen que codifica para la L-catepsina. Gabriela Lombardi, Julián de Almeida, Paula Berguer, Marcela Peper, Virginia Francisco, Pedro Bekinschtein, Christiane Dosne Pasqualini, Isabel Piazzon e Irene Nepomnaschy.

ILEX-CONICET. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. (Fax: 4803-9475)

Los ratones mutantes nactk (nkt/nkt) presentan una disminución en la población CD4⁺ y un aumento de las células dobles positivas (DP) tímicas. Esta deficiencia está asociada a una alteración en el epitelio tímico. Analizamos por citofluorometría de flujo la expresión de marcadores asociados con el proceso de selección tímica. Los resultados se expresan como la media del porcentaje ± DS (n° de animales) en nkt/nkt vs nkt/+. Se observó un aumento en el porcentaje de los timocitos DP TCR^{lo} (90.5±4.5 (5) vs 83.3±3.2(5)(p<0.02)) y una disminución en los porcentajes de TCR^{int} (5.6 ±0.6(5) vs 11.4±0.9(5)(p<0.001)) y TCR^{hi} (1.5±0.3(5) vs 3.78±3.3(5) (p<0.001)). Las poblaciones DP CD69⁺ y DP CD5⁺ estaban también disminuidas: (13.3±0.3(5) vs 21.3±0.8(5) (p<0.02)); (7.9±0.8 (5) vs 14.7 ±0.9(5) (p<0.001)). Estos resultados indican que las primeras etapas de la selección positiva están alteradas. Mediante RT-PCR se determinó que los ratones nactk presentan una delección de alrededor de 100pb en el gen de la L-catepsina, que en el epitelio tímico interviene en la presentación de péptidos propios en el contexto de los antígenos mayores de histocompatibilidad de clase II. Esta mutación sería responsable de las alteraciones en la selección positiva de estos mutantes.

342. Análisis de una porción de los minigenes J_H del locus inmunoglobulina del bovino. Carlos Perez, Ana Jar y Osvaldo Lopez.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (lopez@fvet.uba.ar)

El objetivo de este trabajo fue determinar la estructura de una porción del locus J_H de inmunoglobulinas bovinas. A partir del análisis de transcritos J_H obtenidos de fetos de 210 días, se diseñó un set de primers que hibridizan con regiones conservadas de los dos únicos genes J_H aparentemente expresados. Por PCR se obtuvo un producto de 1032 pares de bases, el cual fue clonado y secuenciado. En este fragmento se pudo localizar en el extremo 5' un gen con un 100% de homología con el que se expresa en mayor proporción en fetos (Berens, S et al, Int. Immunol, 9:189, 1997) al que denominamos J_H1. En el extremo 3' se encontró parte de la secuencia del propuesto gen J_H2. Entre los posibles genes J_H1 y J_H2, se observó la presencia de una secuencia con alta homología con genes J_H. Esta secuencia es posiblemente un pseudogen debido a que su secuencia de recombinación es aberrante y no se ha descrito en transcritos de anticuerpos de bovinos. La comparación con el fragmento J_H del locus inmunoglobulina del ovino, indica una alta homología (>88% de identidad) entre ambas especies incluyendo los intrones. Sin embargo, el pseudogen presenta baja identidad (40%) con el pseudogen ovino. La caracterización de estos genes ayuda a determinar los procesos de mutaciones en el locus inmunoglobulina en el bovino.

343. Identificación de Galectina-1 como uno de los mayores factores inmunosupresores producidos por células de melanoma: un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmune. Natalia Rubinstein¹, Luciana

Molinero¹, Marcela Barrio², Laura Bover², Inés Bravo², Norberto Zwimer¹, José Mordoh², Leonardo Fainboim¹ & Gabriel Rabinovich¹.

¹Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas e

²Instituto Leloir- Fundación Campomar. Universidad de Buenos Aires.

Estudios previos demostraron que células de melanoma producen una proteína de 14 kDa capaz de inhibir la respuesta inmune, facilitando de este modo el escape tumoral y el establecimiento de metástasis. Recientemente, observamos que galectina-1 (Gal-1) es capaz de inducir apoptosis de células T activadas. El objetivo de este estudio fue investigar la participación de Gal-1 en la evasión de la respuesta inmune antitumoral. Ensayos de citometría de flujo y Western blot revelaron que líneas celulares de melanoma humano expresan altos niveles de Gal-1 y la exportan al medio extracelular. Gal-1 fue purificada de sobrenadantes de melanoma por cromatografía de afinidad y filtración molecular y caracterizada bioquímicamente para confirmar su identidad. Su secuencia aminoacídica reveló un 98% de homología con Gal-1 humana. La depleción de Gal-1 de medios condicionados de melanoma por cromatografía de afinidad, fue capaz de revertir en un 45% la inhibición de la respuesta linfoproliferativa a PHA ($p=0,037$). La investigación de los mecanismos moleculares involucrados (a través de ensayos de hipodiploidía, anexina-V, fragmentación e inmunomicroscopía electrónica), demostró que Gal-1 producida por células de melanoma induce apoptosis de células T activadas. Se observó además por inmunocitoquímica y Western blot en melanomas metastásicos, correlación entre la expresión de Gal-1 y su grado de malignidad. El presente estudio postula la expresión de Gal-1 en células de melanoma como un nuevo mecanismo de escape de la respuesta inmune anti-tumoral, evidencia a confirmar *in vivo* utilizando antagonistas específicos.

344. Niveles de acs anti-neumococo en pacientes pediátricos en hemodiálisis que recibieron la vacuna antineumococica 23 valente. Adriana Roy*, Fernando Torletti*, Sandra Martín, Flavia Ramírez, Marta Zelazko*.

Servicio de Inmunología* y Nefrología del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Buenos Aires. (*inmuno@garra.giga.com.ar*).

Introducción: La vacuna antineumococica polivalente está recomendada en niños con enfermedad renal crónica y pre-transplante renal debido al incrementado riesgo de infecciones invasivas. Objetivo: Valorar los niveles de Acs contra los serotipos de neumococo (Ps) responsables de infecciones invasivas prevalentes en nuestro medio (Ps 14, 5, 1 y 6B) en pacientes en hemodiálisis inmunizados con Pneumo 23. Pacientes y Métodos: se estudiaron 10 pacientes mayores a 2 años en plan de hemodiálisis al mes y 6 meses de haber recibido la vacuna Pneumo 23. Se determinó niveles de anticuerpos contra los serotipos 1, 3, 5, 6B y 14 por ELISAs recomendado por el CDC. Se consideró niveles protectores >1.2 ug/ml (según LAGID). Resultados: al mes de la vacunación superaban el nivel de protección: Ps1 en el 50% de los pacientes, Ps3 en el 20%, Ps5 en el 70%, Ps6B en el 40% y Ps14 en el 60 %, a los 6 meses mantenían niveles de protección el 40% para Ps1, el 30% para Ps3, el 80% para Ps5, el 50% para Ps6B y el 70% para Ps14. El 90% de los pacientes tuvieron niveles protectores a los 6 meses para 2 o más serotipos de los 4 prevalentes evaluados. Conclusiones: se encontraron niveles protectores de Acs. contra los serotipos prevalentes en un porcentaje importante de los pacientes inmunizados comprobándose efectividad en la vacunación en este grupo.

345. Evaluación de la respuesta a antígenos polisacáridos en niños con infecciones recidivantes. Fernando Torletti, Adriana Roy, Matías Oleastro, Marta Zelazko.

Servicio de Inmunología. Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Buenos Aires. e-mail: *inmuno@garra.giga.com.ar*

Introducción: La respuesta inadecuada a Acs. polisacáridos (Ps) sin otro defecto inmune define a la entidad: Deficiencia de Acs. con Igs. Normales (IDAIN). En la actualidad la técnica validada es la que evalúa respuesta a diferentes Ps de neumococo, aunque no existe una definición clara de la respuesta normal. Objetivo: Evaluar la respuesta a Ps en pacientes con infecciones recidivantes sin otro defecto de la respuesta humoral. Pacientes y Métodos: 24 pacientes entre 2 y 15 años inmunizados con Pneumo 23. Se determinó niveles de Acs. pre y post inmunización por técnicas de ELISA artesanales recomendadas por el CDC para 5 Ps (Tec1) y por un kit comercial para respuesta a los 23 Ps globalmente (Tec2) más difundida en nuestro medio. Para Tec1 los criterios de respuesta normal en niños entre 2 y 5 años fueron niveles ≥ 0.6 ug/ml para el 60% de los Ps evaluados y para mayores de 5 años niveles ≥ 1.2 ug/ml para el 60% de los Ps (recomendaciones LAGID), para Tec2: respuesta normal ≥ 200 mg/l post inmunización y respuesta intermedia entre 100 y 200 mg/l. Resultados: La respuesta con Tec1 fue normal en 17 pacientes, anormal en 4 y ausente en 3, mientras que con Tec2 10 pacientes tuvieron respuesta normal, 10 intermedia y 4 baja. CONCLUSIONES: Un número importante de pacientes mostraron respuesta inadecuada a Ps y en 3 de ellos se diagnosticó IDAIN. No hubo correlación entre Tec1 y Tec2 .

346. Caracterización de una mutación en el gen WASP: efecto en la transcripción y en la traducción. Jazmin L. El-Hakeh, Marta E. Zelazko, Silvia M. Danielian.

Servicio de Inmunología. Hospital de Pediatría «Juan P. Garrahan». (Fax: 43085325)

El Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es una inmunodeficiencia recesiva ligada al cromosoma "X" caracterizada por trombocitopenia, eczema e infecciones a repetición, causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína WAS. En este reporte se presenta un paciente con manifestaciones clínicas de WAS en el cual identificamos una mutación del gen WAS (811+1 g \Rightarrow a) que implica un cambio puntual en el sitio dador de splicing en el intron 8. Determinamos el efecto de esta mutación a nivel transcripcional: por análisis del mRNA pudimos demostrar la presencia de varios transcritos, una fracción de los cuales representa al producto normal. Para evaluar si existe expresión normal de estos transcritos se realizaron estudios de inmunodetección con un anticuerpo péptido específico dirigido contra el fragmento C-terminal de la proteína WAS. Se observó una expresión muy reducida de la proteína. La presencia de los transcritos con splicing normal y cierta expresión de la proteína WAS se correlacionaría con un fenotipo moderado de la enfermedad (score 3).

347. Inmunofenotipo de dos pacientes con Síndrome de Down (SD) que desarrollaron Síndrome Mielo-proliferativo Transitorio (SMT). Liliana A. Casse, Isabel Gaillard, Liliana Bezrodnik María E. Rivas.

Inmunología. Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. Gallo1330 Capital Fe-deral. Fax 011-4962-8933

El SMT es un desorden hematológico poco frecuente, ocurre principalmente en neonatos con SD. Presentan hiperleucocitosis con elevados porcentajes de células blásticas. El cuadro remite espontáneamente, 1/3 de los SMT desarrolla una Leucemia Mieloide Aguda (LMA) tipo M7. Debido a que es discutida la existencia de factores predictivos de evolución a LMA, se buscó algún factor pronóstico a través de la presencia de un fenotipo aberrante. **Materiales y Métodos:** Médula ósea (MO) y/o sangre periférica (SP) de 2 pacientes con SMT: a) JM, edad 60 días con 120.000 Leucocitos/ mm³ y 54% de blastos en SP. Citogenético: Trisomía 21(47xy+21) y b) KM,

edad 17 días con 284000 Leucocitos/mm³ y 82% de blastos en SP. Citogenético: 60% de los cromosomas con Trisomía 21 y 40% : Trisomía 21+aneuploidia y pseudodiploidia . Fueron marcadas con el siguiente panel de anticuerpos monoclonales: CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD19, CD20, CD13, CD14, CD15, CD33, CD34, CD117, CD61, CD41, CD45, DR. Analizados por citometría de flujo (software Paint a gate). **Resultados:** a)JM 30% de blastos en MO positivos para CD34, CD117,CD33,CD4, CD11b, CD7 y b) KM 63% de blastos en MO positivos para CD34,CD4, CD13,CD7,CD33. Ambos negativos para CD41,CD61. **Observaciones:** 1- ningún paciente presentó fenotipo de precursores megacariocíticos. 2- el fenotipo al diagnóstico fue heterogéneo y expresó un perfil de progenitores mieloides: CD34, CD33, CD7. 3- El control hematológico no reveló blastos en SP a los 3 y 4 meses posteriores al diagnóstico, ambos pacientes hasta la fecha se encuentran en remisión hematológica.

348. Niveles elevados del receptor soluble de interleuquina 2 (sIL-2r) en niños con histiocitosis de células de Langerhans (HCL). Diego Rosso*, Adriana Roy*, Marta Zelazko*, Jorge Braier*.

Hemato-Oncología e Inmunología°, Hospital "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". e-mail: inmuno@garra.giga.com.ar*

Introducción: La HCL es una enfermedad de expresión variable, caracterizada por una proliferación de " histiocitos CD1a+". Estudios previos demostraron que los LiT y/o las CL producirían citoquinas vinculadas a la patogenia de la HCL. **Objetivos:** 1- Medir niveles de sIL-2R en pts con HCL. 2- Correspondencia de dichos niveles con la extensión de la enfermedad. 3- Valorar el efecto del tratamiento. **Población y Métodos:** Sueros de 26 pts con HCL y 12 controles sanos. Los tiempos de extracción coincidieron con las evaluaciones propuestas por el protocolo LCH II (semana 0 [n=26], 6 [n=9] y 24 [n=9]). Acorde al mismo protocolo se estadió a los pts según enf. unisistémica (A), única (A1 n=5) o múltiple (A2 n=6); enf multisistémica (B), sin (B1 n=4) o con compromiso de órganos (B2 n=11). Los dosajes se realizaron con kits ELISA R&D. **RESULTADOS:** La sIL-2R estuvo elevada en los pts (en pg/ml, X +/- SD: 13266 +/-11397 vs 570 +/-94 p<0.0005). También se encontraron diferencias significativas entre el control y el grupo B y el subgrupo B2, entre los grupo A y B y entre los subgrupos B1 y B2, entre los valores de la semana 0 vs 6 y entre semana 0 vs 24. **CONCLUSIONES:** El sIL-2R se encuentra elevado en Pts. con HCL. Los niveles en pacientes multisistémicos son mayores a los de los unisistémicos. El tratamiento no demostró disminuir los valores del sIL-2R en forma significativa.

349. Influencia del eje tiroideo sobre la proliferación de linfocitos T en un modelo murino de depresión reactiva. Alicia Klecha, Graciela Cremaschi, Miriam Wald, Gabriela Gorelik, Ana Genaro.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos – CONICET. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. e-mail: alijut@huemul.ffyb.uba.ar

Estudios realizados tanto en animales como en humanos han sugerido que diversas enfermedades psiquiátricas cursan con alteraciones del sistema inmune. Asimismo en estas patologías se han descripto alteraciones en la función tiroidea. Además hay evidencias que establecen la interacción entre el sistema inmune (SI) y el eje tiroideo (ET). El objetivo de este trabajo fue analizar la interrelación SI-ET en un modelo murino de depresión reactiva por stress crónico. Se determinaron los niveles de hormonas tiroideas en ratones normales (N) y deprimidos (D) (N, T3: 74,8±5,1 ng/dl, T4: 3,11 ± 0,28 ug/dl; D, T3: 57,1±4,2 ng/dl, T4: 2,66 ± 0,15 ug/dl). Además se evaluó la proliferación linfocitaria inducida por Conavalina A (Con A) y fitohemaglutinina (PHA), expresada como índice de estimulación (IE), encontrándose una respuesta menor en los animales con

depresión reactiva (N, IE-ConA: 128 ± 11, PHA: 60 ± 5; D, IE-ConA: 55 ± 5, PHA:15 ± 1). La terapia de reemplazo con T4 (50 ng diaria durante un mes) en los deprimidos hasta alcanzar niveles séricos normales restableció la respuesta proliferativa (IE-ConA: 105 ± 10, PHA: 40 ± 3). No se observaron cambios en la relación CD4+/CD8+ en ninguno de los grupos experimentales. Concluimos que la alteración del eje tiroideo observada en la depresión reactiva influencia significativamente a la respuesta inmune.

350. Detección de crioglobulinas por difusión en gel de agarosa. Estela Motta 1, Analía José 1, Mario Arzeno 2, Elida Civetta 2 y Giorgina Sposetti 2.

Servicios de 1Laboratorio y 2 Clin. Médica H.I.G.A. Dr. O. Alende Mar del Plata.

Las crioglobulinas son proteínas plasmáticas anormales, descritas por Wintrobe y col en 1933, que precipitan o forman un gel en frío que se redisuelve al calentar a 37°C. Estas pueden encontrarse en distintas patologías: gamopatías monoclonales, collagenopatías, hepatitis autoinmunes, hepatitis C etc. La ausencia de crioglobulinas en todos los casos estudiados, por el método convencional, nos llevó a la búsqueda de metodologías alternativas. Okasaki y col. describen una técnica de difusión en gel de agarosa y precipitación en frío para la detección de crioglobulinas. El objetivo de este trabajo fue comparar el método de difusión en gel de agarosa, propuesto por Okasaki y col., con el método convencional de precipitación en frío para la detección de crioglobulinas en suero en pacientes portadores del virus de hepatitis C. Se estudiaron 14 pacientes con hepatitis C (HCV), estudiados por el método convencional de detección de crioglobulinas y el método de difusión en gel de agarosa. En 8/14 (57%) pacientes se detectaron crioglobulinas circulantes por el método de difusión en gel de agarosa y sólo en 3/14 (21%), por el método convencional. Todos los pacientes que presentaron resultados positivos por el método convencional también lo fueron por el método de difusión en gel de agarosa. El método de difusión en gel de agarosa presentó mayor sensibilidad que el convencional, ya que el porcentaje obtenido por la nueva técnica se correlaciona con la prevalencia de crioglobulinas en HCV hallada en otras publicaciones (44 - 54%). Esta nueva metodología es fácil de implementar, sensible y rápida, por lo que creemos que es superior al método convencional.

351. Alelos HLA-DQB y su relación con la infección por HIV-1. Karina Marinic, Patricia Motta, Roxana Lopez, Ernesto Iliovich, Alicia H de Sorrentino.

Histocompatibilidad e Inmunogenética y Servicio de Infectología Hospital J.C. Perrando. Resistencia. Chaco sorro@arnet.com.ar

Las células CTL juegan un rol preponderante en el control de las enfermedades virales ejerciendo su acción citotóxica contra las células infectadas, cuya eficacia depende en gran medida de la interacción con los péptidos presentados en el contexto de moléculas HLA Clase I. Las moléculas HLA Clase II (DR, DP, DQ) son los elementos de restricción para los LT CD4+, responsables de montar una respuesta humoral y de cooperar con la acción citolítica. El objetivo de este estudio fue evaluar en nuestra población si ciertos alelos HLA-DQB se asocian con susceptibilidad y correlacionarlos con la presencia de alelos clase I ya observados en la misma población. Se tipificaron por técnicas de PCR con hibridación inversa 30 individuos de la población normal y 28 pacientes HIV+. El alelo DQB1*0501 fue hallado con mayor frecuencia en la población HIV+, OR = 4.2 y p = 0.08 (p usando test exacto de Fisher), por el contrario, DQB1*0203 se encontró disminuido en esta población (OR = 0.16), no habiendo mayores diferencias en el resto de los alelos estudiados. Se observó, de manera interesante, que aquellos individuos que cargan el alelo DQB1*0501, llevan asociado alguno de los alelos HLA clase I de suscepti-

bilidad (A24, A31 B o B39) reportados en la misma población, lo cual nos hace pensar que la presencia de ambos alelos representaría una mayor desventaja para el huésped, o que estos hallazgos se deben simplemente a un desequilibrio de ligamiento entre dichos alelos.

352. Macrófagos (M) infectados por HIV, aislados de pacientes HIV+ con carga viral indetectable luego del tratamiento anti-retroviral combinado (HAART). Liliana Belmonte, Patricia Baré, Marcelo Corti, María M E de Bracco, Beatriz Ruibal-Ares.

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. e-mail: direccion@iihema.anm.edu.ar.

Se desarrolló un método de cultivo prolongado de células mononucleares periféricas, sin estímulo (CMP s/e) que permite la proliferación y diferenciación completa de los M. Con el mismo se demostró la replicación *in vitro* del HIV (p24+ en el sobrenadante, SN), en 14/15 pacientes HIV+ con carga viral negativa (CV-) (RT-PCR, Amplicor Roche, <400 copias/ml) luego de 8-24 meses de HAART (SN p24, 857±301 pg/ml). En 6/10 pacientes con CV- <50 copias/ml, también se demostró replicación (SN p24, 72±16 pg/ml). Las células infectadas siempre fueron M. Utilizando el sistema standard de co-cultivo con CMP activadas con PHA e IL-2 (CM-PHA), no se habían logrado aislamientos en estos pacientes. Los SN con p24 > 65 pg/ml fueron infectivos para "targets" CMP s/e normales, pre-cultivados 6-7 días. En comparación se utilizaron CMP-PHA. En CMP s/e predominan los M proliferantes (CD64+, Ki67+, CMP s/e=57±4% vs CMP-PHA, <6%) y en CMP-PHA los blastos T (CD3+, Ki67+, CMP-PHA=83±3% vs CMP s/e=12±4 %, p<0.01). La expresión de CCR5 fue mayor en CMP s/e que en CMP-PHA (10±1% vs 5±3%). La susceptibilidad a la infección con SN p24+ cosechados de CMP HIV+ de pacientes con CV indetectable fue mayor en el sistema de CMP s/e que en el de CMP-PHA, probablemente porque el sistema CMP s/e es relativamente más rico en M activados y en proliferación, con co-receptores CCR5, por lo que resulta más apropiado que CMP-PHA para la replicación de las cepas de HIV macrófago-trópicas (R5).

353. Generación y caracterización fenotípica y funcional de líneas T citotóxicas específicas contra Virus de Epstein Barr (EBV). Andrea R. Bernasconi; Mariana Vila Pérez; Albina E. Somardzic; Marta Zelazko; Jorge G. Rossi.

Servicio de Inmunología, Hospital de Pediatría Prof. J.P. Garrahan.

En individuos inmunocompetentes, el EBV causa una infección leve autolimitada, seguida de un período de latencia en el cual la actividad del virus en la célula B está controlada por las células T citotóxicas. En inmunocomprometidos, puede causar enfermedad linfoproliferativa, complicación frecuente en receptores de trasplante. Una posibilidad terapéutica es la generación *ex vivo* de líneas citotóxicas T específicas a partir de células mononucleares totales (CMT) del dador para su infusión. Nuestro objetivo fue generar líneas citotóxicas y estudiar su funcionalidad, fenotipo y especificidad. Primero establecimos líneas linfoblastoides B (LLB) a partir de CMT de 3 individuos no relacionados inmortalizando con EBV (línea B95-8). La línea T específica fue generada cultivando CMT con la LLB autóloga irradiada en presencia de IL2 por varias semanas. Observamos un progresivo aumento de células T CD8+ (75%, día +15), activadas. Se evaluó citotoxicidad por liberación de Cr 51 y producción de IFN γ frente a: LLB autólogas, dos LLB allogeneicas, blastos autólogos generados por estimulación con PHA y la línea K562. La actividad citotóxica (relación 5:1) fue máxima (45%) para la LLB autóloga y 12% y 2% para las LLB allogeneicas, siendo nula frente al resto, lo que sugiere especificidad para EBV y restricción HLA. Esto se correlacionó con la producción de IFN γ por parte de células T específicas contra EBV. Estos resultados preliminares ava-

lan la posibilidad de uso terapéutico de estas células en el futuro.

354. Aumento en la susceptibilidad a la infección ocular con herpes simplex virus tipo I (HSV-I) en ratas malnutridas. Fabián Benencia, Cecilia Courregès, Gisela Gamba, Rubén Benedetti, Rodrigo Gonzalez Videla, Paula Bonorino, Ernesto Massouh.

Laboratorio de Inmunoquímica, Departamento de Química Biológica. FCEN. UBA. fbenen@qb.fcen.uba.ar

En este trabajo estudiamos la susceptibilidad a la infección con HSV-I en ratas malnutridas. Grupos de 10 machos Wistar fueron sometidos a un esquema de malnutrición proteica durante la lactancia por duplicación de camadas. Se consideraron malnutridos (M) aquellos animales que al destete presentaban a lo sumo un 40% del peso de los controles (C). Los animales fueron colocados entonces en dieta comercial y a las 1, 2, 3, 5 y 8 semanas post-destete (p.d.) fueron infectados ocularmente con 105 unidades formadoras de placas (UFP) de HSV-1, cepa F. Se observaron diferencias significativas en la morbilidad y la mortalidad de los grupos M y C infectados a las 3 semanas p.d.: Mortalidad, grupo M, día 12 post-infección=63 ± 7%, grupo C=37 ± 5% (p<0.05). Los títulos de virus recuperado de cerebro y lavados oculares del grupo M fueron significativamente superiores a los del C. Dicho grupo presentó una disminución en la proliferación de esplenitos estimulados con antígeno respecto a los controles y en la respuesta de hipersensibilidad retardada frente a la inoculación con virus inactivado (M=0.26 ± 0.03 mm, C=0.16 ± 0.02 mm, p<0.05). Tanto el título de anticuerpos neutralizantes en suero (Títulos: M=20 ± 4, C=65 ± 3, p<0.05) como la relación IgG2a/IgG1 de anticuerpos específicos anti-HSV se encontraban disminuidos en el grupo M. Se registró una menor capacidad para generar interferón α/β en el grupo M a las 4 horas post-inducción con poli I:C (M=3x103 unidades internacionales [UI]/ml, C=1.2x104 UI/ml). Resultados similares en todos los parámetros mencionados pudieron observarse en los animales malnutridos hasta la semana 5 p.d. inclusive.

355. El SIDA pediátrico temprano se asocia con el HIV-1 inductor de sincicios (SI) y con capacidad replicativa rápida. Julieta Kopka, Marcelo Batalla, Andrea Mangano, *Debora Mecikovsky, *Rosa Bologna, Luisa Sen.

*Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus. *Servicio de Infectología. Hospital "J.P. Garrahan" e-mail: jkopka@garrahan.gov.ar*

Ciertas características fenotípicas del HIV-1 se asocian con la evolución a SIDA en adultos. Un 25-33% de los niños infectados desarrollan SIDA dentro del año de vida. El **objetivo** fue investigar si el SIDA temprano y la inmunosupresión severa en niños se asocian con fenotipos virales más agresivos como la SI y la cinética de replicación más rápida. Se aisló virus de 50 niños infectados por transmisión vertical dentro del año de vida, mediante cocultivos. En 38 niños se determinó la cinética de replicación viral considerándose rápida si la producción de Ag p24 se detectó antes del día 5 de cultivo con un ELISA comercial. La SI se determinó sobre la línea celular MT-2 infectada con el virus aislado de los cocultivos. De los 50 niños, 64% desarrollaron SIDA temprano, de ellos 10 tuvieron HIV-1 SI. Del 36% sin SIDA temprano, sólo 1 tuvo HIV-1 SI (p=0.07). Quince de los 23 niños con SIDA y sólo 4 de los 15 sin SIDA tenían virus con replicación rápida (p=0.04). La inmunosupresión severa se correlacionó con la presencia de virus SI (p=0.002) y SIDA temprano (p=0.003), y no con la capacidad replicativa viral. El alto porcentaje de niños con SIDA temprano podría deberse a que muchos son derivados al hospital para diagnóstico de HIV-1 con sintomatología clínica. Las cepas virales SI se asocian con inmunosupresión severa y con la progresión acelerada a SIDA en pediatría; en cambio la replicación rápida únicamente con ésta última.

356. El Haplotipo HHE del CCR5 facilita la transmisión vertical del HIV-1 y acelera el desarrollo del SIDA infantil. Andrea Mangano¹, Enrique Gonzalez³, Gabriel Catano³, Rosa Bologna², Sunil Ahuja³, Luisa Sen¹.

¹Lab. De Biología Celular y Retrovirus y ²S. Infectología, Htal. "J.P. Garrahan", Bs. As., ³Department of Medicine, University of Texas Health Science Center, USA. amangano@garrahan.gov.ar

Polimorfismos genéticos en el CCR5 se asocian con diferencias en la transmisión y progresión a SIDA. El objetivo del estudio fue investigar la asociación entre los haplotipos del CCR5 (HHA-HHG) con la transmisión vertical y la progresión a SIDA infantil. Se estudiaron 649 niños con exposición perinatal (347 infectados y 302 no infectados) utilizando el ensayo de PCR-RFLP. Las frecuencias obtenidas fueron: 6.5 % HHA, 0.2% HHB, 35 % HHC, 0.6% HHD, 30% HHE, 3.5% HHF1, 14% HHF2, 5% HHG1 y 3.5% HHG2. Sólo la frecuencia del alelo E se halló significativamente aumentada en los niños HIV-1 infectados (35%) vs. no infectados (27%, $P=0.001$). Los haplotipos E/G2 ($P=0.035$), E/E ($P=0.05$) y E/C ($P=0.06$) se asocian con un aumento en la susceptibilidad al HIV-1. Por el contrario C/G2 ($P=0.032$) y C/C ($P=0.06$) se asocian con una menor transmisión viral. Esto indica que el fenotipo asociado con HHG2 (CCR5-Δ32) es altamente dependiente del alelo E acompañante. Por las curvas de Kaplan-Meier, el alelo E se asocia con un desarrollo más acelerado a SIDA ($P=0.01$) con los pares E/E ($P=0.02$), E/G2 ($P=0.01$), y la combinación E + A, D o F1 ($P=0.05$). En cambio, si el E se combina con el F2 (alelo asociado con protección), el efecto negativo se anula ($P=0.74$). El haplotipo F2/C se asocia con la mayor protección a desarrollar SIDA ($P=0.03$). En conclusión, el alelo E favorece la transmisión del HIV-1 y la progresión a SIDA infantil. Las variaciones en el gen del CCR5 son un importante determinante de la susceptibilidad y evolución de la enfermedad.

357. Comportamiento de las subclases de IgA en pacientes pediátricos HIV (+) con *Cryptosporidium parvum*. Claudio Cantisano, Jeanette Balbaryski, Eduardo Gaddi, Héctor Quiroz, Graciela Barboni, Marcela Candi, Vera Giraudi.

Hospital General de Niños Dr. P de Elizalde. División Inmunología Clínica. Buenos Aires. Argentina. [e-mail: gallo@intramed.net.ar](mailto:gallo@intramed.net.ar) Fax: 4902-1408

La IgA es la inmunoglobulina de mayor relevancia del sistema inmune de mucosas. En pacientes adultos HIV (+) la elevación de la IgA está relacionada con la disminución del porcentaje de CD4+ siendo la subclase IgA1 la que se incrementa de modo selectivo. Se propuso estudiar el comportamiento de las subclases de IgA sérica (IgA1, IgA2) en niños HIV (+) con criptosporidiasis entérica (grupo 1), comparando los niveles con los de 15 niños HIV(+) sin *Cryptosporidium parvum* (grupo 2), y con un grupo control de 10 niños sanos HIV (-) (grupo 3) .A su vez los grupos 1 y 2 fueron divididos según los niveles de CD4 (< ó > de 15%). Las subpoblaciones linfocitarias fueron evaluadas por citometría de flujo, la IgA por nefelometría, mientras que las subclases de IgA fueron medidas por inmunodifusión radial. Los niveles séricos de IgA e IgA1 se encuentran significativamente elevados ($p < 0.05$) en los grupos 1 y 2 con respecto al grupo 3, no observándose diferencias significativas de IgA2 entre los distintos grupos. El valor medio de IgA1 en los pacientes de los grupos 1 y 2 con CD4 < 15% fue $361 \pm 168,8$ mg/dl y $368 \pm 159,2$ mg/dl respectivamente, significativamente aumentado con respecto al de los pacientes con CD4 > 15% del grupo 1: $169 \pm 84,5$ mg/dl, y del grupo 2: 178 ± 69 mg/dl. Independientemente de la presencia del oportunista, la liberación de citoquinas asociadas a la mayor inmunosupresión involucradas en la activación del linfocito B, sería responsable del incremento en los niveles de IgA1.

358. Niveles de sL-selectina en la infección pediátrica por HIV. Eduardo Gaddi, Jeanette Balbaryski, Silvina Raiden, Claudio Cantisano, Graciela Barboni, Héctor Quiroz, Marcela Candi, Vera Giraudi.

Hospital General de Niños Dr. P de Elizalde. División Inmunología Clínica. Buenos Aires. Argentina. [e-mail: gallo@intramed.net.ar](mailto:gallo@intramed.net.ar) Fax: 4902-1408

Las moléculas de adhesión permiten a los leucocitos adherirse y comunicarse, siendo esenciales en las respuestas inmunológica e inflamatoria. Sus formas circulantes han sido usadas para monitorear la progresión de distintas enfermedades. Evaluamos los niveles solubles de L-selectina (sL-selectina) en el suero de pacientes HIV (+), comparando además su comportamiento con parámetros de activación inmune (sICAM-1 e IgA) y progresión de enfermedad (LTCD4, LTCD8 y carga viral). Se estudiaron 51 niños HIV (+) en diferentes estadios de enfermedad y 15 niños sanos como controles. Los niveles de sL-selectina e sICAM-1 fueron evaluados mediante ELISA, IgA por nefelometría, LTCD4 y LTCD8 por citometría de flujo, cuantificándose la carga viral por el método Nuclisens Organon. Los niveles de sL-selectina se hallaron significativamente aumentados en la infección por HIV: 2536 ± 684 ng/ml con respecto a los controles 1422 ± 212 ng/ml ($p < 0.05$), observándose diferencias significativas entre el grupo de pacientes con LTCD4 >15%: 2176 ± 570 ng/ (n=26) con respecto al grupo LTCD4 < 15%: 2906 ± 588 ng/ml (n=25). Los niveles de sL-selectina correlacionaron positivamente con los de IgA ($r = 0.31$, $p < 0.05$) y de sICAM-1 ($r = 0.51$, $p < 0.05$), no obteniéndose significancia en la correlación con la carga viral. Los niveles anormales de sL-selectina y su correlación con otros parámetros de progresión de enfermedad, implicarían el compromiso de dicha molécula de adhesión en la inmunopatogénesis de la infección por HIV.

359. Respuesta de citoquinas en mucosa durante la infección intranasal con HSV-1 en el modelo ratón. Efecto de la inhibición de la óxido nítrico sintetasa. Gisela Gamba, Fabián Benencia, Cecilia Courregès, Ernesto Massouh.

Laboratorio de Inmunoquímica, Departamento de Química Biológica. FCEN. UBA. fbenen@qb.fcen.uba.ar

En este trabajo investigamos el efecto que tiene la inactivación de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) sobre distintas citoquinas durante la infección intranasal de ratones Balb/c con herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1), cepa F. Grupos de 10 ratones fueron infectados por vía intranasal con 10^7 UFP del virus y fueron tratados durante cuatro días por la misma vía con distintas concentraciones de aminoguanidina (un inhibidor de la iNOS) en PBS. En los animales tratados pudo observarse un aumento de los títulos virales en turbinatos nasales (Tb) (día 3 post-infección (p.i.): control= 1234 ± 323 UFP/ml; 8 mg/ml AMG= 2535 ± 247 UFP/ml; $p < 0.05$; día 5 control= 315 ± 38 UFP/ml; 8 mg/ml= 706 ± 58 UFP/ml, $p < 0.05$) y pulmones (Pm) (día 5 control: 231 ± 889 UFP/ml; 8 mg/ml= 8973 ± 359 UFP/ml, $p < 0.05$). A distintos días p.i. se extrajo RNA de Tb y Pm a fin de determinar la producción de citoquinas por la técnica RT-PCR. La expresión de iNOS pudo observarse entre los días 2 y 6 p.i.. La inactivación de la iNOS produjo un aumento en la mortalidad de los animales (día 8 p.i., control y 2 mg/ml AMG: 60%; día 6 p.i., 8 y 4 mg/ml: 80%, $p < 0.05$) y alteró el patrón de citoquinas inducidas por la infección expresándose durante más tiempo IL-10, IL-15 y TGF- β a nivel de Tb y Pm. Este aumento en la expresión de citoquinas tipo TH-2 sería una respuesta a la profunda inflamación pulmonar generada por el aumento de la replicación viral en los animales tratados.

REPRODUCCIÓN III

- 360. La expresión de hemoxigenasa (HO) en decidua está aumentada en abortos murinos inducidos por stress mediados por citoquinas Th1.** Ana C. Zenclussen, Ricarda Joachim, Christian Peiser, Evelin Jagen, Burghard Klapp, Petra C. Arck.

Departamento de Medicina. Charité, Campus Virchow Klinik, Universidad de Humboldt, Berlin, Alemania. e-mail: petra.arck@charite.de. Fax: 00493045059943

Existen tres isoformas de HO, HO-1, HO-2 y HO-3. La expresión de HO-1 en varios tejidos está aumentada en eventos oxidativos e inflamatorios; las citoquinas Th1 inducen su síntesis. Ratones expuestos a stress (ultrasonido) durante la gestación temprana muestran una expresión aumentada de citoquinas Th1 durante el fin de la preñez, así como una tasa de resorción fetal (RF) aumentada. No existen reportes acerca de la expresión de HO en placenta y decidua en condiciones de abortos inducidos por stress y mediados por Th1. Hembras CBA/J (x DBA/2J) fueron expuestas a stress en el día 5 de preñez. El útero fue removido el día 13. La expresión de HO-1 y HO-2 en decidua (D) y placenta (P) de ratones control (C) y stress (S) fue evaluada por inmunohistoquímica (IHQ) y por RT-PCR. En S se registró una tasa de RF de 28.51 ± 6.20 (n=13) mientras que en el grupo C fue de 11.80 ± 3.53 , n=12 (p<0.01). La IHQ confirmó la presencia de HO-1 y HO-2 en P y D, con un porcentaje aumentado de microcapilares HO-1+ en S (56.88 ± 3.88 n=5 S vs 32.47 ± 5.21 n=8 Cp<0.01), sin diferencias para HO-2. Sin embargo el uso de RT-PCR nos permitió observar un aumento en la expresión de ambas en P y en D. Los niveles aumentados de citoquinas Th1 en condiciones de stress durante la preñez pueden disparar el aumento de HO, lo cual podría significar una respuesta protectora del embarazo.

- 361. Efecto de la IL-6 humana sobre los niveles de producción de IL-6 endógena en abortadoras murinas.** Gabriela L Gutiérrez, Teresa Gentile, Ricardo A Margni.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral. CONICET-UBA (54 11 4962-0024).

La IL-6 placentaria incrementa in vitro la proporción de anticuerpos monoclonales que se fijan a la Con-A. Por otra parte, el tratamiento con rIL-6h de hembras abortadoras murinas mantiene elevados los niveles de IgG asimétrica al día 10 de la preñez (momento en el cual se producirían los eventos que conducen a la resorción). Esto fue asociado con un descenso del 46% del índice de resorción fetal. Considerando estos antecedentes se propuso evaluar el efecto de esta citoquina sobre los niveles de la IL-6 sérica y placentaria en el modelo CBA/JxDBA tratado vía ip, con 2500U de rIL-6h al día 6 y 10 de la preñez. Los niveles de IL-6 fueron determinados por ELISA empleando anticuerpos comerciales. A nivel placentario se detectaron un promedio de 280 pg/ml en las hembras tratadas, mientras que en las no tratadas el nivel de IL-6 fue de 53 pg/ml. En cambio en los sueros de estos animales no se encontraron diferencias significativas ($40,5$ vs $54,29$ pg/ml respectivamente). Estos resultados sugerirían que el tratamiento con IL-6h estimularía la producción de IL-6 placentaria sin modificar los niveles sistémicos, lo que señalaría la importancia de la acción local de la citoquina sobre el éxito de la preñez.

- 362. Hipertiroidismo crónico produce involución de la glándula mamaria de rata lactante.** Silvia Varas, Estela Muñoz, Claudia Aguilera Merlo, Graciela Jahn y Sofía Giménez.

Dpto de Bioquímica. Fac. de Qca, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. Lab. de Reproducción y Lactancia. CONICET. Mza. e-mail: svaras@unsl.edu.ar

El hipertiroidismo crónico (HT) produce alteraciones en la morfología de glándula mamaria (GM), disminución de peso de las crías y cambios en el metabolismo de los lípidos. Se estudió el efecto del HT sobre la funcionalidad de la glándula mamaria, haciendo experimentos de separación y succión y determinando la presencia de células apoptóticas. Los núcleos apoptóticos en GM se detectaron sobre secciones de parafina por TUNEL. Se usaron ratas HT (0.1 mg/kg T₄ s.c., comenzado 14 días antes de aparear) y controles durante la lactancia. Luego de 8hs de separación de la camada y 30 min de succión, las ratas HT tuvieron niveles disminuidos de PRL (Co: 362 ± 45 ; HT: 238 ± 30 ng/ml), ocitocina (Co: 54 ± 6 ; HT: 36 ± 4 ng/ml) y GH (Co: 6 ± 1.2 ; HT: 3 ± 0.2 ng/ml), y las camadas sacaron menos leche (Co: 4.7 ± 0.9 ; HT: 1.7 ± 0.6 g). La tasa de crecimiento de las camadas HT estuvo disminuida, así como los niveles de PRL maternos en los días 7, 14 y 21 de lactancia. Las muestras de GM mostraron índices de apoptosis aumentados en las ratas HT en el día 21 de lactancia, en el día 14 hubo células apoptóticas en el tejido conectivo. Así, el HT inhibió la respuesta hormonal y de eyección láctea a la succión, lo que puede haber contribuido al menor crecimiento de la camada HT, así como a los cambios histológicos observados en la GM. No se puede descartar efectos directos adicionales del HT sobre la GM.

- 363. Estimación del riesgo reproductivo en varones con semen anormal usando FISH para las aneuploidías más frecuentes.** Roberto Cocco, Claudia Sartori, Fabián Cocco, Alicia Gallo, Nicolás Neuspiller.

Fecunditas; Instituto Medicina Reproductiva. e-mail: Fecunditas@Fecunditas.com.ar

Introducción: Está documentado que el ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) posibilita convertir en padres genéticos a varones con semen anormal y que es mayor la frecuencia de nacidos con aneuploidías respecto de la población general de nacidos. **Objetivos:** Estimar la producción de espermatozoides anormales usando FISH (hibridación in situ fluorescente) con sondas de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. **Pacientes y Métodos:** Se estudiaron a 10 pacientes infértiles, que accedieron al ICSI. El FISH se realizó sobre espermatozoides decondensados con dos mezclas de sondas: 18,X,Y y 13,21. Se analizaron 1000 espermatozoides por mezcla y se registraron las aneuploidías. Se estimó la producción total de espermatozoides anormales con la fórmula: $P = Ps (Pr)^{22}$, y se relacionó con los resultados del ICSI en cuanto al logro (grupos I o no del embarazo (grupos II)). **Resultados:** La producción de espermatozoides anormales en el grupo I (20.4%) fue significativamente menor que el del grupo II (38.0%) p<0.05. **Conclusiones:** Se infiere que la aplicación del FISH preconcepcionalmente permite evaluar riesgo reproductivo y tomar medidas preventivas.

- 364. Estudio del posible origen dual (epididimario y testicular) de la proteína DE unida al espermatozoide.** Vanina Da Ros¹, Mauro Morgenfeld¹, Dolores Busso¹, Diego Ellerman¹, Masaru Hayashi² y Patricia Cuasnicú¹.

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET-UBA, Bs As, Argentina; ²Universidad de Hokkaido, Sapporo, Japón. (vgdars@dna.uba.ar)

La glicoproteína DE se asocia a la superficie de los espermatozoides durante el proceso de maduración. Mientras una población se une débilmente durante el tránsito epididimario y se pierde durante la capacitación, otra aparece fuertemente unida desde el caput y participa en el proceso de fusión de gametas. Dado que recientes resultados han demostrado el origen dual (testicular y epididimario) de varias proteínas que se asocian al espermatozoide en el epidídimo, el objetivo del trabajo consistió en investigar la posibilidad de que la proteína fuertemente unida sea de origen testicular. Teniendo en cuenta la alta homología de DE con la proteína testicular

TPX-1 (67%) y la similitud de sus pesos moleculares, primeramente se estudió si la población fuertemente unida correspondía a TPX-1. Ensayos de Western Blot sobre extractos de proteínas provenientes de espermatozoides epididimarios y testiculares, utilizando anti-DE y anti-TPX-1, descartaron dicha posibilidad al no detectarse reacción cruzada. Con el fin de descartar la posibilidad de que el gen correspondiente a DE se expresara a nivel testicular, se realizó RT-PCR a partir de tejido epididimario y testicular empleándose primers específicos para DE. Una banda de 723pb, correspondiente al mensajero de DE, se detectó únicamente en epididimo. En conjunto, los resultados indicarían el origen epididimario de la proteína DE presente en el espermatozoide y que finalmente participa en el proceso de fertilización.

365. Acción del medio condicionado de tejido oviductal sobre espermatozoides humanos. Sergio Ghersevich, Ileana Quintero, Adriana Caille, María José Munuce, Stella Daniele, Lida Morisoli.

Area Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

e-mail: sghersev@fbioyf.unr.edu.ar

Durante su paso por el oviducto los espermatozoides (sp) están expuestos a la acción del fluido oviductal. El objetivo de este trabajo fue analizar la acción del medio condicionado (MC) de cultivo de tejido oviductal enriquecido en componentes de PM > 10 kDa sobre sp humanos. Los tejidos tubarios provenientes de 8 pacientes premenopáusicas se cultivaron en medio MEM en presencia de [S³⁵-Met] durante 6 h, a 37°C y 5 % CO₂. El sobrenadante de cada cultivo se concentró con un filtro de corte de 10 kDa. Los sp móviles de donantes fértiles fueron incubados 2 h con ó sin 10 % v/v del MC en PBS. Se determinaron viabilidad y motilidad espermáticas (según criterio OMS), el patrón acrosomal por tinción fluorescente con *Pisum sativum* y la presencia de [S³⁵]-proteínas del MC en la fracción de membrana de los sp utilizando SDS-PAGE y autorradiografía. Se detectó la presencia de una proteína de PM estimado en 74 kDa. En presencia del MC la viabilidad (85.0 ± 2.2 % vs. 72.0 ± 4.0 %, p<0.01) y el porcentaje de sp progresivos (49.7 ± 5.5 % vs. 13.0 ± 4.6 %, p<0.001) resultaron significativamente mayores que en los controles (media±SEM). No hubo cambios en el patrón acrosomal en presencia del MC respecto del control. Existe al menos una proteína (de 74 kDa) del MC capaz de unirse a la membrana de los sp. El MC atenuó la mortalidad espermática y permitió mantener la motilidad de los sp sin afectar el status acrosomal.

366. Moduladores del metabolismo lipídico en el embrión en etapa de organogénesis. Débora Sinner, Alicia Jawerbaum, Carolina Pustovrh, Verónica White, Martha Gimeno, Elida González.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. CONICET. elidate@arnet.com.ar

Se determina la importancia de los triglicéridos (TG) como depósitos energéticos intracelulares en el embrión (Emb) de rata en etapa de organogénesis temprana, y el efecto de PGE₂ y 15deoxy-delta-PGJ₂ (15dPGJ) como moduladores del metabolismo lipídico. En Emb de 11 días de gesta se dosó el contenido de TG (ensayo colorimétrico) después de 1 h de incubación (medio Krebs) en presencia o no de PGE₂, 15dPGJ e inhibidores de la COX. A tiempo 0, el contenido de TG (ug/emb) es mayor (0.8±0.1) que luego de 1 h de incubación (0.33±0.07, p<0.02). Dichos valores no son modificados por aspirina (0.36±0.07) ni por NS398 (0.41±0.08). La presencia de PGE₂ (0.6±0.07, p<0.05) y 15dPGJ (0.61±0.08, p<0.05) incrementa el contenido de TG. Para determinar si dichas PGs impiden un evento lipolítico o inducen lipogénesis, se evalúa la incorporación de ¹⁴C-acetato a TG (uCi/emb) durante 1 y 3 hs de incubación. Se evidencia síntesis de TG a los 60 min

(0.02±0.001, control tpo 0: 0.009±0.001), que se incrementan en presencia de PGE₂ (0.05±0.006, p<0.01) y de 15dPGJ (0.04±0.006 p<0.05); y a los 180 min se observa mayor incorporación (0.113±0.002), incrementada por PGE₂ (0.37±0.05p<0.001) y 15dPGJ (0.25 ±0.03 p<0.05). Estos resultados muestran que el Emb utiliza sus reservas de TG en períodos cortos, en los cuales también hay síntesis de TG, que es estimulada por PGE₂ y por 15dPGJ, resultados que serán de utilidad para evaluar los mecanismos de sobreacumulación embrionaria de lípidos en patologías tales como la diabetes.

367. El antigestágeno RU486 induce hipersecreción de prolactina por su acción antigluco corticoide. Rubén Carón, Elina Guinazú, Carlos Telleria, Ricardo Deis.

Laboratorio de Reproducción y Lactancia, Conicet, Mendoza. e-mail: rcaron@lab.cricyt.edu.ar

Hemos previamente demostrado que la administración del antiprogesterona-antigluco corticoide RU486 (1-10 mg/kg) al medio día del proestro, produce hipersecreción de prolactina (PRL), LH y progesterona el día del estro en ratas en ciclo. Además, dicho tratamiento afectó el comportamiento sexual y el éxito reproductivo durante el ciclo (1). El presente estudio tuvo por objeto determinar si la hipersecreción de PRL inducida por el antigestágeno fue debida al efecto antiprogesterona o antigluco corticoide de la droga. Para ello, ratas de la cepa Wistar con ciclo regular de 4 días, fueron inyectadas s.c. con vehículo ó 5 mg/kg de RU486 (mifepristona) a las 12.00 h del día del proestro, sangradas por la vena caudal a las 18.00 h del mismo día y decapitadas a las 18.00 del día siguiente (estro). La administración de RU486 no modificó la concentración sérica de PRL del proestro, pero aumentó significativamente sus valores en el estro. Para evaluar la actividad antigluco corticoide del RU486, grupos adicionales recibieron un dosis alta de dexametasona previo al RU486, o anticuerpo antiprogesterona, en lugar de éste. La dexametasona previno la hipersecreción de PRL inducida por RU486 en el estro, mientras que el anticuerpo antiprogesterona no tuvo efecto. Estos resultados sugieren un papel de los glucocorticoides endógenos inhibiendo la secreción de PRL en la tarde del estro en ratas cíclicas. 1) Telleria, Mezzadri y Deis. (1997), *Contraception* 56:267-274.

368. Péptidos opioides en la regulación de la secreción de prolactina al final de la preñez en la rata. Marta Soaje*, Claudia Bregonzio**, Ricardo Deis.*

*Laboratorio de Reproducción y Lactancia, Conicet, Mendoza. **Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

Los opioides endógenos (O.E) participan en la regulación de la secreción de prolactina (PRL) en el proestro, preñez y lactancia. Al final de la preñez se demostró: 1) la activación del receptor u opioide estimula la secreción de PRL sin existir una correlación con los niveles de dopamina (DA), 2) los OE mantienen un tono inhibitorio sobre la secreción de PRL que es dependiente de progesterona. El **objetivo** del presente trabajo fue establecer a través de qué mecanismo los OE estimulan la secreción de PRL. **Metodología:** ratas en el día 19 de preñez fueron implantadas en el ventrículo lateral el día 15. Naloxona (NAL) ketanserina y SR 95531 (SR) fueron administrados 15 min antes de DAMGO (15.30 h) y muestras de sangre se obtuvieron por decapitación a las 16 h para la determinación de PRL por RIA. **Resultados:** NAL (2 mg/kg, i.p.) y SR (15 ng / rata, icv) bloquearon la acción estimuladora de DAMGO: 60 ± 16 ng/ml vs 3.0 ± 0.3 ng/ml; NAL: 6.0 ± 0.5 ng / ml; SR: 10 ± 2 ng ml). El tratamiento previo con ketanserina (10 mg/kg, v.o) facilitó una mayor descarga de PRL luego de la administración de DAMGO (173 ± 40 ng/ml). **Conclusiones:** Los resultados indican que: 1) la activación del receptor u opioide estimula la secreción de PRL y sugieren que una vía

GABAérgica está involucrada, 2) la acción inhibitoria de serotonina al final de la preñez involucraría una interacción con el sistema opioide.

369. Efecto de FSH sobre la producción de inhibina B y ProalfaC en células de Sertoli inmaduras en cultivo. Stella Campo, Verónica Ambao, Romina Trigo, Silvina Creus, María Ballerini, Nigel Groome¹, Eliana Pellizzari, Selva Cigorraga.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina; e-mail: scampo@cedie.guti.gov.ar. ¹Oxford Brookes University, Oxford, Inglaterra

La secreción de inhibinas, péptidos de origen gonadal, es regulada por FSH. Sin embargo, durante la infancia se ha descrito la posible secreción autónoma de inhibina B. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de distintas preparaciones de FSH sobre la producción de inhibina B y ProalfaC en cultivos de células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días. Se utilizó: standard pituitario de FSH humana (hFSH-2), FSH recombinante humana (hrFSH) y análogos de carga aislados hrFSH por isoelectrofoque: rango de pl: 2.5-4 (ácidos, AC) y 5-7 (básicos, BA). Se determinaron los niveles de Inhibina B y ProalfaC (pg/ml) por ELISA, y los de AMPc y Estradiol (E₂) por RIA. Se observó una producción dosis-dependiente de ProalfaC, AMPc y E₂ con hFSH-2 y hrFSH (0.156-1.2 ng/ml). Los niveles de inhibina B fueron similares en condiciones basales y con FSH: Basal: 1330±50.9; 1.2 ng/ml hFSH-2: 1405±18.5; 1.2 ng/ml hrFSH 1294±60.2. Análogos de carga BA produjeron una mayor estimulación de AMPc y E₂ que idénticas dosis de AC. Por el contrario, estos últimos análogos produjeron la mayor estimulación en la producción de ProalfaC: basal: 69.8±14; 1.2 ng/ml AC: 251.5±12; 1.2 ng/ml BA: 83±5.7. Estos resultados sugieren que la FSH, particularmente los análogos de carga más ácidos, estimula sólo la producción de la forma monomérica de inhibina (ProalfaC) en las células de Sertoli inmaduras; mientras que la inhibina B es producida por estas células en forma independiente del estímulo gonadotrófico.

INFECTOLOGIA I

370. Anticuerpos anti-VRS y Linfocitos T en niños asmáticos. Ana M Maldonado, Cristina V Torres, Alejandro G Taranilla, Elizabeth M Witowski

*Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto
e-mail: CuartoCCuartonado@exa.unrc.edu.ar*

En alérgicos menores de 4 años, el agente etiológico más frecuente de infecciones respiratorias severas, es el VRS. IgE-anti-VRS, podría ser un factor relacionado a la etiopatogenia del asma. Se estudiaron niños de 6-48 meses: 24 asmáticos post-bronquiolitis, 8 asmáticos sin antecedentes de bronquiolitis y 8 sin asma ni bronquiolitis. Se investigaron: a) Acs anti-VRS por IFI. b) IgE-anti-VRS por inhibición de EIA c) Recuento de LT por RE. Se demostraron por IFI Acs anti-VRS en 23/24 sueros, p<0.01. IgE estuvo elevada en 82%. Se demostró IgE-anti-VRS en 100%, p<0.05. Los LT no mostraron diferencias con los controles. La infección por VRS podría ser un factor desencadenante de asma en el lactante. El VRS estimuló la síntesis de IgE específica. La mayoría de lactantes con IgE-anti-VRS no tendrían deterioro en los valores de LT.

371. Antibiotipos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes quemados y de otros orígenes y su relación con exoproductos. Noemí Steyerthal¹, Nicolás Pregi¹, Marcelo Marín², Jaime Kovensky³.

¹Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
²Centro de Estudios Infectológicos. Ciudad de Buenos

Aires. ³Hospital de Quemados del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. e-mail: noemil@qb.fcen.uba.ar

Las *Pseudomonas aeruginosa* constituyen uno de los mayores problemas en el control de las infecciones hospitalarias debido a su condición ubicua y a su resistencia a la mayoría de los anti-microbianos. El propósito del presente estudio es: 1-determinar el antibiograma de cepas provenientes de pacientes quemados admitidos en el Hospital de Quemados (10 cepas – Grupo Nº 1) y de urocultivos de pacientes ambulatorios con algún episodio previo de internación en distintos hospitales (11 cepas – Grupo Nº 2). 2-medir cuantitativamente los niveles de proteasa total y de elastasa. 3-relacionar las determinaciones realizadas en los puntos anteriores. Las actividades proteolítica total y de elastasa se cuantificaron usando como sustrato hide powder azure y elastin congo red respectivamente. Las cepas pertenecientes al grupo Nº 1 muestran una resistencia del 60% para ceftazidima (caz) y 40% para imipenem (imp) y el grupo Nº 2, 9% para caz y 0% para imp. Concluimos que existe sensibilidad diferente frente a los antimicrobianos en relación al origen de la cepa. Cepas con altos valores de proteasa total (>1 A₅₉₅/mg prot h) y de elastasa (>0.5 A₄₉₅/mg prot h) resultaron ser sensibles en un 82%-87% al imp y las de bajo nivel de elastasa (<0.5) fueron sensibles a la piperacilina (71%). Por lo tanto comprobamos que las sensibilidades a determinados antimicrobianos son distintas en relación con las exoenzimas medidas. Una cepa aislada de agua de consumo presentó resultados concordantes con los hallados.

372. Transmisión vertical de potenciales recombinantes B/F de HIV-1 en primoinfección durante la gestación. Ana Ceballos, Roberto Rabinovich, Liliana Martínez Peralta, Patricia Coll*, Carlos Zala*, María Mercedes Avila.

*Centro Nacional de Referencia de SIDA. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina. UBA. (e-mail: anaceballos@hotmail.com) *Hospital J. Fernández. Presentado por la Dra. Duvilanski*

Durante los últimos años se ha demostrado en Argentina y Brasil la presencia del subtipo B, el F y recombinantes B/F de HIV-1. En este trabajo se estudiaron 2 casos de mujeres de Buenos Aires que cursaron su primoinfección con HIV-1 durante el embarazo y transmitieron el virus a sus hijos. Se determinaron las secuencias de los dos pares de madre-hijo, H1-M1 y H2-M2. A partir de células mononucleares de sangre periférica se amplificó por PCR anidada de la región C2V3 del gen *env* del HIV-1 y se obtuvieron las secuencias nucleotídicas. Los árboles filogenéticos se obtuvieron mediante los métodos de Neighbor-Joining y Máxima verosimilitud. Para identificar la presencia de recombinación genética se utilizó un programa específico (Recombination Identification Program, RIP). Se determinó que las secuencias correspondientes al par H2-M2 se agrupaban con las secuencias de referencia del subtipo B y las del par H1-M1 se agrupaban con las secuencias de referencia del subtipo F. Los resultados del RIP mostraron que las 4 secuencias presentaban patrones que potencialmente corresponden a recombinantes B/F aunque con distinto grado de probabilidad. La presencia en nuestro país de posibles recombinantes B/F, detectadas especialmente en poblaciones infectadas por vía heterosexual asociada a su capacidad de ser transmitidas por vía vertical debe ser tenida en cuenta para su prevención.

373. Estudio de la infección y genotipificación del virus de hepatitis C (HCV) en pacientes pediátricos. ¹María Gismondi; ²María Preciado, ³Isabel Badía de Lapunzina ¹Saúl Grinstein.

¹Laboratorio de Virología, ²Servicio de Hepatología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez
e-mail: virologia.hnrg@usa.net

El virus de la hepatitis C (HCV) es un flavivirus, principal agente etiológico de las hepatitis no A no B. Se lo clasifica en

seis genotipos según variaciones en la secuencia del extremo 5' no codificante (5'UTR) de su genoma. Las infecciones pediátricas por HCV no son comunes y generalmente se adquieren por transfusiones o verticalmente. Estas últimas presentan una evolución variable. La existencia de una infección por HIV y HCV en las madres facilita la transmisión vertical. Nos propusimos investigar la presencia y genotipificar HCV en muestras pediátricas. Se estudiaron 27 pacientes con diagnóstico de infección por HCV del Serv. Hepatología de nuestro hospital, 12 transfusionales, 11 verticales y 4 sin vía de transmisión conocida, rango de edad 1 mes-22 años (mediana 5 años). A partir de muestras de suero se extrajo el RNA y se amplificó por RT-PCR *nested* un fragmento de 297pb de 5'-UTR. Se genotipificó por RFLP digiriendo con enzimas de restricción este amplicón. De los 27 pacientes HCV+ por RT-PCR *nested* se genotipificaron 13 de los cuales se tenía más de una muestra. Los casos genotipificados fueron: 7 transfusionales (2 genotipo 1a, 3 genotipo 1b, 1 genotipo 1?, 1 genotipo 3a) y 6 verticales (3 genotipo 1a, 1 genotipo 1b, 1 genotipo 1?, 1 genotipo 2a). En 2/6 casos verticales se estudió la muestra materna la cual presentó el mismo genotipo que el hijo. Conclusión: 1) una alta frecuencia de genotipo 1 en pacientes pediátricos, que coincide con la distribución mundial, 2) el genotipo permaneció constante en muestras sucesivas, y también en casos de transmisión madre-hijo, 3) la genotipificación tendría aplicación como marcador pronóstico y/o de respuesta al tratamiento

374. Caracterización antigénica y genómica de virus influenza que circularon en Argentina en el período 1995-1999. Andrea Pontoriero, Elsa Baumeister, Ana Campos, Vilma Savy.

Servicio Virus Respiratorios, Departamento Virología, INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

Introducción: El análisis de virus influenza (Flu) epidémicos se basa en la caracterización de la hemaglutinina viral (HA) con el objeto de detectar nuevas variantes para la recomendación de las cepas vacunales. **Objetivos.** 1)- Caracterización antigénica y genómica de cepas Flu obtenidas a partir de la vigilancia de influenza en Argentina, 2)- Comparación entre las cepas circulantes y las cepas vacunales que se utilizaron en cada temporada. **Métodos:** Se recolectaron cepas de Flu durante un período de 5 años (1995-1999). A partir de muestras clínicas Flu positivas, se realizó el aislamiento viral en células MDCK. Los aislamientos se caracterizaron antigénicamente por inhibición de la hemaglutinación con antisueros cepa-específica. La caracterización genómica consistió en RT-PCR seguido de secuencia de la porción HA1 de la HA. La comparación entre las cepas circulantes y de referencia fue analizada por construcción de árboles de filogenia. **Resultados:** Las cepas A H3N2 que circularon coincidieron con las H3N2 vacunales sólo en 1999. Las cepas A H1N1 coincidieron con las vacunales en 1996, se relacionaron antigénicamente en 1997 y no se relacionaron en 1999. Con respecto a los Flu B, sólo en 1995 las cepas circulantes no se relacionaron con la vacunal. **Conclusiones:** Los resultados muestran la importancia de la vigilancia de laboratorio para formular las vacunas adecuadas.

375. Influencia de la respuesta inmunológica en la evolución de la infección por virus de la Hepatitis C (VHC). Natalia Baldo, Valeria Mas.

Laboratorio de Inmunología, Hospital Privado, Centro Médico de Córdoba. (bmhla@arnet.com.ar)

La infección por VHC es una de las principales causas de las hepatitis post-transfusionales noA-noB. La prevalencia de VHC es de 45% y 47,5% en hemodiálisis y receptores de trasplante renal (TR). Buscamos la asociación entre presencia de autoanticuerpos (autoAcs) y la infección, ya que la progresión de la enfermedad podría asociarse al estado inmunológico

del huésped. Se estudió la presencia de autoAcs AML, AMT, ANA, ANCA, LKM por IFI, FR por aglutinación de partículas de látex y valoramos las cargas virales (CV) (índice de actividad viral) por RT-PCR (Amplicor-Monitor) en 85 pacientes infectados con HVC, 38 pacientes inmunocompetentes (IC) y 47 pacientes inmunosuprimidos (IS) (17 hemodializados (HD) y 30 TR). El FR fue (+) en 18,42% en IC y en 12,76% en IS (4,25% en HD y 8,5% en TR). ANA mostró 7,9% en pacientes IC y no se observó en pacientes IS. AML, AMT y LKM fueron (-) en todos los grupos de pacientes. Las CV para HVC fueron: 185.770 copias (c) de RNA/ml en IC vs 184.920 c. de RNA/ml en HD (p=0,84), 185.770 c. de RNA/ml en IC vs 411.180 c. de RNA/ml en TR (p=0,01), 184.920 c. de RNA/ml en HD vs 411.180 c. de RNA/ml en TR (p=0,14). No hay asociación entre autoAcs e infección por HVC. Los niveles de CV no presentan asociación con la presencia de autoAcs. Se observaron valores significativos entre los niveles de CV de pacientes IC y TR.

376. Caracterización de estafilococos coagulasa negativa aislados de neonatos mediante PCR fingerprinting. ^{1,2}Isabel Bogado; ^{1,2}Limansky, Adriana; ²Sutich, Emma; ²Marchiaro, Patricia; ²Marzi, Marta y ^{1,2}Viale, Alejandro.

¹Instituto Biología Molecular y Celular, CONICET ²Depto de Microbiología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR; Rosario. Fax: 0341-4390465.

Los estafilococos coagulasa negativa (ECN) constituyen agentes infecciosos en neonatos. Se propuso analizar la persistencia o reinfección y la probable transmisión cruzada de los mismos. Se estudiaron 40 cepas de ECN (33 *S. epidermidis*, 5 *S. hominis*, 1 *S. warneri* y 1 *S. auricularis*) de Neonatología y 4 *S. epidermidis* de otros servicios. La genotipificación se realizó por amplificación del ADN con oligonucleótidos arbitrarios (RAPD) o específicos (rep-PCR). Las dos metodologías permitieron distinguir entre sí las distintas especies. Además, rep-PCR reveló 3 perfiles diferentes (A', B', C') dentro de los 33 *S. epidermidis*, mientras que RAPD mostró 4 perfiles (A, B, C, D). Ambos métodos señalaron al clon A' (27 cepas con rep-PCR) o al A (26 cepas con RAPD) como predominante, e indicaron la persistencia del mismo en 7 casos. Los 4 aislamientos de *S. epidermidis* no relacionados mostraron 4 perfiles distintos con RAPD (E, F, G, H) y diferentes de los anteriores, mientras que rep-PCR detectó 3 (el C' mencionado, D' y E'). La presencia y persistencia de *S. hominis* en un paciente pudo ser comprobada con las dos técnicas. Así, ambas metodologías permitieron sugerir la transmisión cruzada de un clon y la persistencia del mismo en infecciones recurrentes. Sin embargo, RAPD demostró ser el método más discriminatorio para detectar diversidad genómica intraespecie.

377. Subclases de IgG específicas en enfermos de Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) que presentaron Síndrome Neurológico Tardío (SNT). Sottosanti Josefa, Saavedra Carmen, Riera Laura, Ambrosio Ana.

*Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. J. I. Maiztegui".
e-mail: iveness@satlink.com.ar*

Estudios previos han demostrado la presencia de IgG1 e IgG3 en la infección humana por virus Junin (VJ). Un 10% de los enfermos de FHA que reciben Plasma Inmune (PI) como tratamiento desarrollan durante la convalecencia un SNT. El objetivo de este trabajo fue estudiar las subclases de IgG en LCR y suero de estos pacientes (n= 15). Se tomaron muestras de LCR y suero I durante el curso del SNT (30 días pos infección) y suero II posterior al mismo (60/90 días pos infección). La técnica utilizada fue IFI en células Vero infectadas con VJ. Se utilizaron Mab anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 y anti-IgG4 humanos conjugados con FITC. Las frecuencias de detección y el rango de títulos obtenidos:

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
LCR	53,3%	0 %	6,7%	0%
	8-32	—	8	—
Suero I	00,0%	6,7%	40,0%	0%
	8-2048	8	8-64	—
Suero II	100,0%	40,0%	73,0%	0%
	1024-16384	8-64	8-64	—

Estos resultados indican: (a) IgG1 es la subclase prevalente en LCR y suero durante el SNT. (b) IgG3, que caracteriza al 33% de los casos graves de FHA, en el 73% de los SNT. (c) La aparición de IgG2. Estos hallazgos sugieren un patrón diferente en la distribución de subclases de IgG en el SNT.

378. Susceptibilidad del virus Junín a derivados sintéticos análogos de brassinosteroides: Mecanismo de acción.

Viviana Castilla¹, Mónica Wachsmann¹, Natalia Aguirre Sgalippa¹, Javier Ramírez², Lydia Galagovsky² y Celia Coto¹. Laboratorio de Virología¹

Departamento de Química Biológica y Departamento de Química Orgánica², Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires
e-mail virocoto@qb.fcen.uba.ar

Hemos demostrado que 11 análogos sintéticos del brassinosteroides natural 24(S)-etil-brassinona inhiben la multiplicación de los arnavirus Tacaribe y Junín (VJ) en cultivos celulares. En este trabajo se ensayaron otros 10 derivados con distintas sustituciones en los anillos A y B y en la cadena lateral. Aunque algunos de ellos resultaron activos, ninguno superó el índice de selectividad (IS) encontrado con el compuesto (22S, 23S, 24S)-24-etil-3B-bromo-trihidroxi-colestan-6-ona (6b) cuyo IS es de 682. Este derivado fue seleccionado para estudiar el mecanismo de acción antiviral. En primer lugar se determinó la dosis no tóxica mediante marcación con metionina-S³⁵ de proteínas de células Vero, siendo la dosis óptima de 50 µg/ml. Luego, se determinó que 6b no interfiere con la adsorción viral. En cambio, el agregado de 6b a distintos tiempos a lo largo del ciclo de multiplicación del VJ demostró que el efecto inhibitorio se observa cuando el compuesto está presente en las primeras 4 horas post-adsorción (95%). Esta acción sobre las etapas tempranas de la multiplicación viral se confirmó mediante el análisis de la síntesis de proteínas virales por SDS-PAGE y de la expresión de antígeno viral detectada por inmunofluorescencia indirecta en células infectadas y tratadas con 6b a distintos tiempos post-infección. Estos resultados sugieren que el blanco afectado por el antiviral sería la expresión temprana de los genes virales.

379. Determinación del genotipo de Adenovirus infectante en pacientes pediátricos internados por infección respiratoria aguda baja. Paola Barrero, Rubén Zandomeni, Alicia Mistchenko.

Laboratorio de Virología, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Gallo 1330 (1425) Buenos Aires. TE/FAX:4963-7569. Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, INTA, Castelar.

En Argentina, la infección por adenovirus 7h ha sido asociada frecuentemente con casos fatales y enfermedad pulmonar crónica. En este estudio se revisaron los hallazgos clínicos de 7 niños hospitalizados por infección respiratoria aguda baja en el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. En todos los casos se obtuvieron aspirados nasofaríngeos a partir de los cuales se realizaron inmunofluorescencia (IF) específica, aislamiento en células 293, PCR-RFLP y secuenciación del gen hexón. Los pacientes fueron internados por bronquiolitis (4/7) o neumonía (3/7). Todos los pacientes requirieron suplemento de oxígeno. Tres pacientes fueron dados de alta a los 4-5 días de hospitalización, un paciente desarrolló enfermedad pulmonar

crónica y dos casos resultaron fatales. La infección por adenovirus fue confirmada en todos los casos por IF y los virus fueron aislados en cultivo de células. Se determinó subgénero: cluster por PCR-RFLP con la enzima de restricción TaqI en geles de poliacrilamida al 12%. Todos los casos pertenecían al subgénero B, 6/7 fueron B:1 y 1/7 B:2. PCR del gen hexón y análisis de su secuencia demostraron que 1/7 casos se relacionaba con el serotipo 11 y 6/7 con el serotipo 7: 4/6 fueron genotipo 7h y 2/6 fueron genotipo 7g. Los casos moderados con buena evolución se asociaron con el genotipo 7g y serotipo 11. Los casos fatales y recurrentes se relacionaron con el genotipo 7h. Estos datos constituyen un primer paso hacia la posible elucidación de las relaciones entre la evolución clínica y el genotipo infectante.

FARMACOLOGIA I

380. Distribución renal y hepática de sulfanilamida en ratas con calcinosis arterial. Nora Quaglia * y Adriana Torres.

Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. CONICET. (*) Farmacología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Email: adtorres@fbioyf.unr.edu.ar.

Se han descrito modificaciones en la farmacocinética de aniones orgánicos en animales con calcinosis arterial. En el presente trabajo se evaluó la distribución renal y hepática de sulfanilamida (SA, droga usada como modelo de anión orgánico), y de su metabolito acetilado (SAA) en ratas controles (C, n = 5) y en ratas tratadas con vitamina D3 (300000 UI/kg de p.c.; i.m., diez días antes del experimento, T, n = 7). Se administró una dosis de SA (0.4 mg/kg p.c.; i.v.), y se recogieron muestras de sangre desde los 0.25 a los 15 min. A los 15 min se extrajeron hígado (h) y riñones (r). Se dosó en todas las muestras SA y SAA. Los niveles plasmáticos de SA en función del tiempo se ajustaron a un modelo bicompartimental. Se obtuvieron los siguientes valores de constante de velocidad de eliminación de SA (Beta, min⁻¹): C: 0.060 ± 0.002 vs T: 0.069 ± 0.003*. A partir de las concentraciones plasmáticas de SAA en función del tiempo se calcularon las constantes de velocidad de aparición de SAA (K_{apSAA}, min⁻¹): C: 0.304 ± 0.013 vs T: 0.445 ± 0.028*. Las cantidades de SA y SAA acumuladas (µg/g prot.) en h y r fueron: SA h: C: 0.377 ± 0.056 vs T: 0.232 ± 0.019*; SA r: C: 0.421 ± 0.020 vs T: 0.291 ± 0.013*; SAA h: C: 0.264 ± 0.034 vs T: 0.493 ± 0.033*; SAA r: C: 0.330 ± 0.034 vs T: 0.351 ± 0.035; (*, P<0.05). Se puede evidenciar una mayor acumulación de SAA en el hígado de las ratas tratadas que se debería a un aumento de la metabolización de la droga a ese nivel.

381. Activación de óxido nítrico sintasa mediada por receptores muscarínicos de acetilcolina en parótida de rata. Florencia Rosignoli, Claudia Pérez Leirós.

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. CONICET. (rosignol@qb.fcen.uba.ar)

La respuesta secretoria y vasodilatadora de las glándulas salivales está regulada principalmente por receptores muscarínicos que en diversos tejidos están acoplados a la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) y guanilil ciclasa. Nuestro objetivo es investigar la participación de estas señales en la secreción de amilasa mediada por receptores muscarínicos en parótidas de rata. Se midió la actividad de NOS con L-[U¹⁴C]-arginina como sustrato en parótida entera y acinos y la secreción de amilasa como actividad liberada sobre total por un método colorimétrico. La actividad de NOS presentó un efecto máximo a 10⁻⁶ M de carbacol (pmol/mg tejido; x±SEM: basal 478±55, carbacol 10⁻⁶M: 1035±104; n=4). El efecto fue inhibi-

do por 4-DAMP en todo el rango de concentraciones y por pirenzepina (pz) a 10^{-6} M de carbacol, mostrando la participación de receptores M_3 y M_1 . Los ensayos de competición de la unión de 3 H-QNB a membranas de parótida con 4-DAMP y pz indicaron una población mayoritaria M_3 y una menor de sitios M_1 de alta afinidad (K_i pz, $x \pm SD$; 26 ± 19 nM, $n=4$). El aumento de los niveles de GMPC y la secreción de amilasa inducidos por carbacol fue inhibido por L-NAME, azul de metileno y 4-DAMP pero no por pz. Concluimos que el carbacol estimula la NOS en parótida a través de receptores M_3 y M_1 , siendo M_3 el subtipo que media la secreción de amilasa asociada a NOS.

382. Alteraciones del sistema colinérgico producidas por drogas porfirinogénicas. Jorge Rodríguez*, Mariana Fossati#, Ana Buzaleh*, Julio Azcurra#, Alcira Battle*.

Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porfirias (CIPYP)-(CONICET), Depto Química Biológica, FCEN-UBA.# Laboratorio de Biología Celular, Depto de Biología. FCEN-UBA.(anamaria@qb.fcen.uba.ar)

En el SNC existen dos enzimas que hidrolizan la acetilcolina (ACh): la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BuChE). Dada la similitud entre los síntomas neurológicos presentes en los pacientes con Porfiria Aguda Intermitente y los encontrados en sujetos expuestos a agentes inhibidores de las colinesterasas, resultó de interés evaluar la existencia de una interacción entre la acción de compuestos porfirinogénicos y las alteraciones del sistema colinérgico. Se midió actividad de AChE y BuChE en corteza, cerebelo e hipocampo de ratón y los niveles del receptor de ACh muscarínico (mAChR). Se observaron cambios en la transmisión colinérgica central. Los inhibidores de colinesterasa presentaron diferencias en cuanto a su afinidad por los receptores colinérgicos. El veronal inhibió la actividad de BuChE en corteza ($VC=20 \pm 6$, $VT=5,8 \pm 2,4$), cerebelo ($VC=6,5 \pm 2,4$; $VT=5,0 \pm 1,4$) e hipocampo ($VC=17,9 \pm 6,9$; $VT=9,162 \pm 3,0$). Se vio una concomitante disminución en los niveles de mAChR ($VC=0,070 \pm 0,002$; $VT=0,0050 \pm 0,001$). El Enflurano disminuyó los niveles de mAChR en cerebelo ($VT=0,056 \pm 0,0002$) e hipocampo ($0,050 \pm 0,003$). Una inhibición diferencial de las colinesterasas en las distintas regiones del cerebro y sus consecuentes efectos pueden ser factores importantes para el conocimiento de la neurotoxicidad diferencial de las drogas porfirinogénicas.

383. Estudio hemorreológico comparativo según la vía de administración de *Ligaria cuneifolia* (Lc). Guillermo Mengarelli¹, Mariana Ferrero¹, Alicia Dominighini¹, Marcelo Wagner³, Alberto Gurni³, Luján Alvarez², Cristina Carnovale², Alejandra Luquita¹.

¹ Fac Cs. Médicas, ² Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR. ³ Fac. Cs. Bioqcas. y Farmacéuticas-UBA. luquitale@hotmail.com

Lc, es una planta hemiparásita que ha sido utilizada como sustituto natural del muérdago de origen europeo. **Objetivo:** analizar el efecto del tratamiento con Lc sobre la fluidez de la sangre utilizando dos vías de administración: intraperitoneal (ip) e intravenosa (iv). **Métodos:** Ratas Wistar machos adultos Control (C) ($n=5$) inyectadas con Solución Fisiológica y Tratadas (T) ($n=5$, cada uno) inyectadas cada 24 horas durante 3 días ip y durante 1 día iv, con 2,5 y 5,5 mg/100g peso corporal. **Resultados:** (x media \pm ES). Viscosidad sanguínea (después de ajustar a un hematocrito del 45%): C: $4,65 \pm 0,43$; $T_{2,5,ip}$: $8,47 \pm 0,75$ **; $T_{2,5,iv}$: $6,56 \pm 0,29$ **; $T_{5,5,ip}$: $7,27 \pm 0,35$ *; $T_{5,5,iv}$: $7,07 \pm 0,50$ **. Índice de rigidez: C: $5,05 \pm 0,17$; $T_{2,5,ip}$: $17,25 \pm 2,39$ **; $T_{2,5,iv}$: $6,45 \pm 0,30$ **; $T_{5,5,ip}$: $13,00 \pm 0,99$ **; $T_{5,5,iv}$: $14,2 \pm 2,60$ *. Descenso de colesterol plasmático: $T_{2,5,ip}$: $17,25 \pm 1,65$ *; $T_{2,5,iv}$: $5,0 \pm 1,3$; $T_{5,5,ip}$: $18,60 \pm 3,00$ **; $T_{5,5,iv}$: $5,5 \pm 2,8$. Volumen Corpuscular Medio (VCM): C: $57,37 \pm 4,4$; $T_{2,5,ip}$: $51,73 \pm 4,84$ (ns); $T_{2,5,iv}$: $70,8 \pm 1,29$ *; $T_{5,5,ip}$: $56,25 \pm 2,40$ (ns); $T_{5,5,iv}$: $61,3 \pm 2,8$ *. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto de C). **Conclusión:** En administración iv no se observa la dismi-

nución de colesterol plasmático como por vía ip, en ambas vías está aumentada la viscosidad y el índice de rigidez, por lo cual la acción de Lc sería en iv directamente sobre el volumen del glóbulo rojo (VCM).

384. Posible participación de la vía de la lipoxigenasa en el acoplamiento de los receptores a cininas B_1 en vena umbilical humana. Verónica Rey-Ares, Eliana Marengo, Santiago Serrano, Manuel Wolfson, Rodolfo Rothlin.

III Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. (e-mail: farmaco3@fmed.uba.ar)

Aparentemente, en vena umbilical humana (VUH) el efecto vasoconstrictor por estímulo de los receptores a cininas B_1 y B_2 se encuentra acoplado a la vía de la COX-2 (resultados enviados para su publicación). El objetivo de este trabajo fue evaluar en este tejido la posible participación de la vía de la lipoxigenasa (LOX) en la transducción de las respuestas contráctiles mediadas por los receptores a cininas B_1 . Se emplearon anillos de VUH montados bajo tensión isométrica en una solución de Krebs a 37°C , burbujeados con carbógeno. Luego de 5 h se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) a des-Arg⁹-bradiginina (BK), agonista selectivo de los receptores B_1 a cininas, en ausencia y en presencia (30 min antes de la CCR) de los siguientes inhibidores: NDGA, inhibidor inespecífico de la LOX, 3uM; Rev-5901, inhibidor de la 5-LOX, 3uM; AA-861, inhibidor de la 5-LOX, 3uM y MK-886, inhibidor de la proteína activadora de la LOX (*Flap*), 30uM. Estos agentes produjeron una significativa ($p > 0,05$) inhibición de las CCR a des-Arg⁹-BK (pCE_{50} : control $7,64 \pm 0,06$, NDGA $7,40 \pm 0,04$, $n=6$; control $7,66 \pm 0,05$, Rev-5901 $7,23 \pm 0,08$, $n=3$; control $7,62 \pm 0,05$, AA-861 $7,09 \pm 0,16$, $n=6$; control $7,64 \pm 0,13$, MK-886 $7,12 \pm 0,11$, $n=5$). Estos resultados sugieren que en la VUH el acoplamiento de las respuestas vasoconstrictoras mediadas por estímulo de los receptores a cininas B_1 también podría involucrar la vía de la LOX.

385. Más sobre la caracterización funcional del receptor adrenérgico α_{1B} en vena umbilical humana. Andrea Errasti, Federico Daray, Laura Luciani, Julián Tramontano y Rodolfo Rothlin.

III Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. farmaco3@fmed.uba.ar

En vena umbilical humana (VUH), hemos demostrado que la adrenalina (A) produce vasoconstricción mediada principalmente por el subtipo α_{1B} de receptores adrenérgicos (Errasti y col.; Br. J. Pharmacol. 126:437-442, 1999). El objetivo de este trabajo fue extender la caracterización de este receptor mediante el empleo de bloqueantes selectivos α_{1B} , cyclazosin (Cy, pK_i : 9,7), AH11110A (AH, pK_i : 7,5), spiperone (Sp, pK_i : 8,8). Se midió la tensión isométrica en anillos de VUH obtenidos a partir de cordones umbilicales de partos normales a término, equilibrados a 37°C en solución de Krebs, pH 7,4 y burbujeados con 95% O_2 / 5% CO_2 . Los antagonistas fueron evaluados en curvas concentración respuesta (CCR) a A luego de 2h de estabilización del tejido. AH (0,01- 0,1- 1uM) y Sp (0,01- 0,03- 0,1- 1uM) se aplicaron 30 minutos antes de la CCR mientras que 1h antes se aplicó Cy (0,3- 1- 10nM). Todas las concentraciones de Sp y AH produjeron un corrimiento de la CCR a A de tipo competitivo, mientras que Cy demostró propiedades bloqueantes de tipo no competitivo. Los valores de afinidad obtenidos para los bloqueantes fueron: AH ($pA_2 = 7,9 \pm 0,15$ $n=8$); Sp ($pA_2 = 8,7 \pm 0,11$ $n=11$) y Cy ($pK_b = 9,83 \pm 0,33$ $n=6$). Los resultados obtenidos en VUH con estos agentes bloqueantes representan evidencia adicional que la vasoconstricción inducida por A depende del estímulo de receptores α_{1B} en este tejido.

386. Respuestas vasoconstrictoras al ácido araquidónico en vena umbilical humana: posible participación de ambas ciclooxigenasas. Verónica Rey-Ares¹, Santiago

Serrano¹, Federico Daray¹, Cristina Paz², Ernesto Podestá², Rodolfo Rothlin¹.

¹III Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. (e-mail: farmaco3@fmed.uba.ar).

²Departamento de bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Aparentemente, en vena umbilical humana (VUH) la vasoconstricción por estímulo de los receptores a cininas B₁ y B₂ se encuentra acoplado a la vía de la COX-2 (resultados enviados para su publicación). El objetivo de este trabajo fue evaluar: 1) el efecto vasoconstrictor del ácido araquidónico (AA), 2) qué isoenzima/s de la COX está/n involucrada/s en este efecto 3) que prostanoides está/n involucrado/s en esta respuesta. Anillos de VUH se montaron bajo tensión isométrica en solución de Krebs a 37°C. Luego de 5 h se realizaron curvas concentración respuesta (CCR) a AA (pCE₅₀: 4,87±0,19; resp.max.:11,3±1,3g;n=11). Estas respuestas fueron deprimidas por un inhibidor de COX-1, indometacina 10nM (resp.max.: control 12,6±1,4g; n=6; tratado 6,4±2,8g; n=5; p<0,05) y por uno de COX-2, NS-398, 3uM (resp.max.: control 12,5±1,9g; n=7; tratado 5,3±1,5g; n=4; p<0,05) aplicados 30 min antes de la CCR. Por western blot se demostró la presencia de ambas isoenzimas de la COX luego de 5 h. El AH-6809 (1uM, 30 min), antagonista selectivo del receptor EP1, bloqueó las respuestas a AA (resp.max.: control 11,8±2,0 g; tratado 7,4±1,4 g; n=5). La prostaglandina E₂ (PGE₂), agonista EP1, produjo contracción (pCE₅₀: 6,32±0,06g; resp.max.: 18,5±2,6g; n=5). El AA extracelular produce contracción en VUH probablemente a través de un acoplamiento que involucre ambas isoformas de la COX, siendo la PGE₂ un posible mediador de este efecto.

387. Efecto del Clonixinato de lisina sobre las ciclooxigenasas I y II y sobre la NO sintasa de cerebro de rata.

Ana Franchi, Mariana Farina, Diego Ogando, María Ribeiro, Guillermo Di Girolamo, Antonio Raúl de los Santos, Manuel Luis Martí, Martha Alicia Fernández de Gimeno.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. (CONICET – Facultad de Medicina-UBA).

Las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINES) son efectivas en el tratamiento de los procesos inflamatorios, debido a la acción inhibitoria sobre la síntesis de prostaglandinas. Sin embargo existe evidencia creciente de la participación del óxido nítrico (NO) en los procesos flogósicos. En este trabajo estudiamos el efecto del CL sobre la actividad de las ciclooxigenasas (COX) I y II y la NO sintasa (NOS). La actividad de las COX se evaluó por radioc conversión mientras que la de las NOS por la técnica de Snyder modificada. El CL administrado en dosis de 4, 10, 20 mg/kg i.p. fue incapaz de modificar la síntesis de PGE₂ de los animales controles, y sólo la dosis de 40 mg/kg disminuyó dicha síntesis en un 43%. La enzima involucrada en la producción de las PGs en la condición control es la COX-I. El lipopolisacárido (LPS), administrado para inducir la COX-II, produjo un aumento del 76% de la conversión a PGE₂ luego de 6 horas de inyectado. El CL bloqueó, en todas las dosis estudiadas, el aumento de síntesis de PGE₂. El LPS también aumentó la producción de NO por el Cerebelo (C: 11088+718cpm/100 mg de peso húmedo, LPS: 16272+1263 p<0.01), efecto que fue inhibido por la co-inyección de 10 (13894+763), 20 (13544+1137) y 40 (12661+1085) mg/kg de CL. Estos resultados sugieren que el CL in vivo inhibe la producción de NO y la de PGs debidas a la actividad de la COX-II.

388. ¿Puede ser modificado el deposito renal de lípidos en el síndrome nefrótico con enalapril o diltiazem?

Jorge Toblli, Graciela De Rosa, Gabriel Cao, Cristina Nyberg, Margarita Angerosa.

Laboratorio de Medicina Experimental Hospital Alemán & Departamento de Patología Hospital de Clínicas.

La hiperlipemia a demostrado inducir y acelerar el daño renal tanto a nivel glomerular como tubulointerstitial. Por su parte, enalapril (E) y diltiazem (DTZ) mostraron ser efectivos contra la progresión del daño renal crónico en diversas nefropatías. Nuestro objetivo: evaluar el rol de E y DTZ sobre el deposito renal de lípidos (DRL) en ratas nefróticas (RN) por Adriamicina (AD). Machos SD con AD (7.5mg/kg) I.V. dosis única. G1 (n=20) RN con agua, G2 (n=20) RN+DTZ 25mg/l y G3 (=20) RN+E 20mg/l en el agua. Se evaluó presión arterial sistólica (PAS), Cl de creatinina (Clcr.); proteinuria (Up), colesterol (Col) y triglicéridos (TG). Se utilizó el score de Raji (KI 1984; 26:137-143) modificado para valorar DRL. Resultados en 8va. semana:

Media ± DS	G1 NR	G2 NR + DTZ	G3 NR + E
PAS (mmHg)	134.3 ± 7.6#	121.1 ± 3.9	119 ± 3.2
Cl.cr. (ml/min)	0.70 ± 0.11	0.91 ± 0.17*	1.16 ± 0.12**
Up (mg/día)	440.5 ± 68	256.2 ± 83.2*	118 ± 56.1**
Col (mg/dl)	378.3 ± 114.4	356.7 ± 128.8	344.7 ± 107.6
TG (mg/dl)	408.7 ± 102	370.3 ± 91.1	374.6 ± 129
Score DRL	184.1 ± 31.5	193.9 ± 19.5	57.5 ± 3.4**

vs. G2 & G3 p<0.01. *vs. G1 p<0.01. **vs. G1 & G2 p<0.01.

Conclusión: DTZ y E disminuyen similarmente la PAS. E se asoció a mayor Clcr. y menor Up. No obstante similar Col y TG en todos los grupos, el de E mostró un menor score DRL.

NEFROLOGIA III

389. Efectos de isquemia-reperfusión sobre la actividad, abundancia y distribución de la Na⁺, K⁺-ATPasa cortical renal en rata.

Gabriela Coux, Laura Trumper, Mónica Elías.

Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. (gcoux@agatha.unr.edu.ar)

Hemos descripto que 40 min de isquemia seguidos de 60 min de perfusión (I40R60) en un modelo de isquemia unilateral en rata provocan aumentos significativos en la excreción de Na⁺ y agua, entre otras modificaciones. Nuestro objetivo fue estudiar las alteraciones de las actividades de Na⁺, K⁺-ATPasa y fosfatasa alcalina (FA) y la abundancia de Na⁺, K⁺-ATPasa (por Western blot) en homogenados de corteza y membranas apicales y basolaterales aisladas en este modelo de insuficiencia renal. I40R60 presentó una disminución significativa de la actividad de Na⁺, K⁺-ATPasa en membranas típicamente basolaterales (C=78.2 ± 5.6, I40R60=41.7 ± 13.7 umol/h.mg prot, p<0.01) y un aumento en las típicamente apicales (C=9.7 ± 1.5, I40R60=22.5 ± 2.7 umol/h.mg prot, p<0.05). La actividad de FA fue significativamente menor en I40R60 en las membranas habitualmente enriquecidas en esta enzima (C= 0.96 ± 0.14, I40R60=0.46 ± 0.04 UI/mg prot, p<0.05). La abundancia de Na⁺, K⁺-ATPasa en I40R60 fue significativamente mayor tanto en homogenados como en todas las membranas aisladas. Estos datos muestran un comportamiento disociado entre actividad y abundancia de Na⁺, K⁺-ATPasa en I40R60. La aparición de mayor actividad de Na⁺, K⁺-ATPasa en membranas apicales y su disminución en las basolaterales podría explicar en parte la mayor excreción de Na⁺ observada.

390. Expresión temporal de marcadores de proliferación y de organización tisular en la corteza renal de ratas en desarrollo posnatal.

María Gabriela Márquez, Isabel Cabrera, Diego Javier Serrano, María Cecilia Reyes, Norma Speziale.

Cátedra de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

En mamíferos el riñón no se encuentra completamente desarrollado al nacimiento y presenta una gran desorganización celular. Los contactos focales son sitios de anclaje de las células a la matriz extracelular. Objetivos: estudiar la relación temporal de la expresión de una proteína de los contactos focales (vinculina) y de proliferación celular (PCNA: Proliferating cell nuclear antigen que se asocia al núcleo en la fase S del ciclo celular) en la corteza renal de ratas Wistar en desarrollo posnatal (5, 7, 10 y 70 días) mediante inmunohistoquímica. Resultados: 1) se observan células PCNA+ a los 5, 7 y 10 días en zonas nefrogénicas (carentes de nefrones formados) y células vinculina+ en los nefrones completamente formados y en túbulos colectores; 2) se observan células PCNA+ en TCP y TCD organizados sólo a los 10 días de desarrollo posnatal; 3) escasas células PCNA+ y la totalidad de las células vinculina+ en toda la corteza renal a los 70 días, indicando que la mayoría de las células se encuentran ancladas a la matriz extracelular. Conclusiones: se observa una relación inversa entre la expresión de los marcadores de proliferación y de organización tisular. Este ciclo de unión-desunión posibilita a la célula renal dividirse, diferenciarse y reorganizar sus uniones con la matriz extracelular o con otras células hasta formar un riñón maduro.

391. Hipertensión arterial y daño vascular renal en la glomerulopatía por polisacáridos. Jorge Toblli, Graciela De Rosa, Nestor Lago, Gabriel Cao, Margarita Angerosa.

Laboratorio de Medicina Experimental Hospital Alemán & Departamento de Patología Hospital de Clínicas.

La hipertensión arterial (HA) es un factor de mal pronóstico en las enfermedades renales. La glomerulopatía mesangial por el depósito de inmunocomplejos circulantes (ICC) a su vez es una de las variedades más frecuentes de nefropatía. Nuestro objetivo: evaluar posibles cambios en presión arterial (PA) con relación al daño vascular renal (DVR) en un modelo de glomerulopatía por ICC. Ratas SD(100-120g). Durante 4 semanas G1(n=12) con alcohol polivinílico (APV) s.c. y G2 Cont.(n=12) con vehículo. Se realizó M. óptica y electrónica (ME) y evaluó: 1) Expansión mesangial (ExMes), 2) DVR, 3) depósito de APV en pared arterial.

Media ± DS	G1 (APV)	G2 (Cont.)	P
PAS (mmHg)	140.3 ± 6.2	122.8 ± 5.0	< 0.01
Cl. Cr.(ml/min)	1.2 ± 0.1	1.23 ± 0.13	NS
Proteinuria (mg/día)	18.9 ± 12.7	6.4 ± 3.8	< 0.01
Hematies/Campo	8.3 ± 3	2.1 ± 1.8	< 0.01
Score ExMes	1.58 ± 0.84	0.2 ± 0.39	< 0.01
Score DVR	1.41 ± 0.73	0.12 ± 0.22	< 0.01

Correlación (Spearman): 1) Score ExMes con PAS = r: 0.2496, p= NS; 2) Score DVR con PAS = r: 0.7666, p<0.01. La ME detectó APV en pared arteriolar, mesangio y capilares peritubulares. En conclusión el compromiso de la pared por ICC podría estar involucrado en el desarrollo de la HA en ausencia de cambios significativos del filtrado glomerular en este modelo.

392. Miofibroblastos y respuesta a corticoides en síndrome nefrótico por Cambios Mínimos. Graciela De Rosa, Gabriel Cao, Rurico Ibarra, Jorge Toblli.

Departamento de Patología Hospital de Clínicas & Servicio de Nefrología Hospital Alemán.

El tratamiento de la glomerulopatía a cambios mínimos (CM) continua siendo un desafío por su alta tasa de recidiva, dependencia o resistencia a la corticoideoterapia (CT). El miofibroblasto (Mfb) célula involucrada en procesos de cronicidad ha sido poco explorado en este contexto. Nuestro objetivo fue determinar si en CM la presencia de Mfb intersticial influye en la respuesta a la CT. Se estudiaron 20 casos, 15 niños de 7 ± 4 años y 5 adultos de 32 ± 9 años con síndrome

nefrótico y diagnóstico de CM por biopsia renal los cuales presentaban al momento de la misma corticodependencia con recaídas frecuentes (CS) G1 (n=7) o corticoresistencia (CR), G2 (n=13). Los Mfb fueron identificados mediante inmunomarcación con anticuerpo monoclonal anti actina de músculo liso (SMA). La cuantificación se obtuvo extrayendo el promedio de células intersticiales positivas en 10 campos sucesivos elegidos al azar, para lo cual se utilizó una grilla ocular de 0.0529 u² excluyéndose del conteo glomerulos y vasos. Se utilizó test de Mann-Whitney con alfa = 0.05. Resultados (media ± DS): 1) Proteinuria (mg/kg/día) G1 CS= 247.8 ± 181.9 vs. G2 CR= 183.8 ± 101.5 (p= NS); 2) No. de Mfb/área G1 CS= 6.6 ± 1.8 vs. G2 CR= 8.7 ± 1.9 (p= 0.023). Estos resultados sugieren que la corticoresistencia en CM tanto en niños como en adultos podría vincularse a la presencia de un mayor número de Mfb en el intersticio renal.

393. Valor pronóstico del infiltrado linfocitario en el intersticio renal en Artritis Reumatoidea. Gabriel Cao, Graciela De Rosa, Rurico Ibarra, Jorge Toblli.

Departamento de Patología Hospital de Clínicas & Servicio de Nefrología Hospital Alemán.

El deterioro de la función renal ha sido recientemente vinculado al daño tubulointersticial en la mayoría de las nefropatías. Por otra parte, el compromiso del intersticio renal es un hecho frecuente en numerosas enfermedades reumáticas. Con el objetivo de establecer una relación entre el componente inflamatorio crónico en el intersticio renal y la función renal en pacientes con Artritis Reumatoidea (AR) se desarrolló este estudio. Se seleccionaron 28 pacientes de sexo femenino de 36 ± 11 años de edad, que reunían criterios de ARA para AR, con biopsia renal (BR). Se evaluaron parámetros bioquímico como creatinemia (Cr.) y proteinuria (Upr.) Además se procesaron las muestras de BR para su análisis morfológico mediante microscopía óptica. Se realizó análisis de regresión múltiple (ARM), utilizando como variable dependiente la Cr. e independientes: a) Upr; b) fibrosis intersticial (FI); c) atrofia tubular (AT); d) infiltrado linfocitario (Inf-Linf). Resultados (media ± DS): 1) Cr.: 1,56 ± 1,6 mg/dl; 2) Upr. 4,1 ± 4,8 g/día; 3) FI%: 6,36 ± 6; 4) AT%: 6,31 ± 5,9; 5) Inf-Linf: 9,42 ± 8,9 linfocitos/5,29 x10⁴u². El ARM demostró que el Inf-Linf fue la variable más significativa en el ascenso de la Cr. (p< 0,05; r= 0,5987). Estos resultados sugieren que el infiltrado linfocitario crónico en el intersticio renal puede influenciar negativamente en la función renal de pacientes con AR.

394. Modificaciones ligadas al sexo en la farmacodinamia de la furosemida (FS) en ratas. Anabel Brandoni, Jorgelina Cerrutti, Nora Quaglia y Adriana Torres.

Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. CONICET. Email: adtorres@fbioyf.unr.edu.ar

Hemos demostrado que existe diferencia ligada al sexo en la depuración sistémica y renal de aniones orgánicos (entre ellos FS). El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de FS sobre la función renal en ratas Wistar machos (♂, n = 6) y hembras (♀, n = 6). Los animales se prepararon para técnicas convencionales de clearance. Se les inyectó una dosis de carga seguida por una infusión continua (1 ml/min/kg p.c.) de una solución conteniendo inulina y FS (se administró la dosis de FS necesaria para obtener idénticas cargas excretadas de la droga en ambos sexos). Luego de 45 min de equilibración se recolectaron dos períodos de clearance de 20 min cada uno. Se determinaron carga excretada de FS (CE_{FS}, ug/min/100g, p.c.), niveles plasmáticos de FS (Cp_{FS}, ug/ml), velocidad de filtración glomerular (VFG, ml/min/100g, p.c.), excreciones fraccionales de agua (EF%_{H₂O}), sodio (EF%_{Na}) y potasio (EF%_K). Resultados (*P<0.05): CE_{FS}: ♂ = 28.90 ± 2.35, ♀ = 28.17 ± 1.84; Cp_{FS}: ♂ = 105 ± 13, ♀ = 173 ± 7*; VFG: ♂ =

0.356 ± 0.042, ♀ = 0.243 ± 0.012*; EF% H_2O : ♂ = 12.08 ± 1.21, ♀ = 15.79 ± 0.52*; EF%Na : ♂ = 12.85 ± 1.24, ♀ = 16.56 ± 0.83*; EF%K : ♂ = 99 ± 9; ♀ = 189 ± 31*. Conclusiones: Las ♀ presentan una mayor respuesta diurética, natriurética y calurética que los ♂ a idénticas CE_{FS} . Estos resultados evidenciarían una diferencia ligada al sexo en la farmacodinamia de la FS.

MESA INTERDISCIPLINARIA

395. Nuevo polimorfismo del promotor del gen del receptor de la hormona liberadora de tirotrófina humana (hTRHR) está asociado a hipertensión esencial (HE). Fabiana Leonardi, Silvia I. García, Guillermo Dieuzeide, Adrian Perusco, Patricia I. Porto, Raúl S. Spataro, Tobias Kirsznner, Yankel Plotquin, Carlos J. Pirola.

Servicio de Hipertensión, Htal Zubizarreta (Bs As), CAIDEM (Chacabuco, Pcia Bs As), Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari (UBA, Bs As).

La TRH central participa en la regulación cardiovascular y su sobreexpresión produce hipertensión reversible por tratamiento antisense (AS) en la rata normal y en las SHR. La HE está asociada a un microsatélite polimórfico en el promotor del gen del hTRHR. Analizamos la presencia de otras variantes moleculares del promotor y exón 1 de este gen mediante PCR y electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (SSCP) en 37 normotensos (NT) y 104 hipertensos (HT) adultos. Ambos grupos sólo difirieron en el BMI y MVI. Se encontraron 4 polimorfismos. Uno en la posición -221 de la región 5' UTR cercana al microsatélite. La secuenciación del fragmento mostró una variación G por C que destruye un sitio para la enzima Ddel. El análisis de los 282 cromosomas mostró que las frecuencias de ambos alelos son 1) elevadas (aprox 50%), lo que indicaría un polimorfismo común de nucleótido único (SNP) y 2) diferentes entre normotensos e hipertensos adultos. Para confirmar esta asociación estudiamos 125 NT y 49 HT adolescentes (estudiantes de Chacabuco). Un análisis de regresión logística discriminante mostró que este SNP está asociado a HE (OR: 1.82, IC95:1.008-10.9) en forma independiente de la edad, sexo y talla. Estos resultados sugieren que el alelo gen del hTRHR es un factor de riesgo genético para la HE.

396. Estudios sobre la participación del Factor Inhibidor de Leucemia (LIF) en el desarrollo normal y neoplásico de la glándula mamaria. Carolina Schere-Levy, Valeria Buggiano y Edith Kordon.

ILEX-CONICET, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

El LIF es capaz de inducir distintos efectos según el tipo celular. Nuestro propósito fue, ya que no existen reportes al respecto, determinar si el LIF se expresa en tumores mamaros experimentales y si el mismo participa en el desarrollo y/o involución del tejido mamaro normal. Nuestros resultados (por RT-PCR, Northern blot e inmunohistoquímica) muestran que el LIF es expresado en los 10 tumores mamaros estudiados. Además, hallamos que el mensajero de LIF (mLIF) y el de su receptor (mRLIF) se expresa en la mama en distintas etapas de su desarrollo. Por RT-PCR semi-cuantitativo hallamos que mientras que los niveles mRLIF se mantienen constantes, los de mLIF varían según la etapa de desarrollo de la mama. Particularmente observamos que el mLIF disminuye durante la preñez hasta casi desaparecer durante la lactancia. Sin embargo, a 20 horas de iniciada la involución post-lactancia, los niveles de mLIF superan los alcanzados en cualquiera de los otros estadios estudiados. Además, hallamos que, en la línea celular de mama normal de ratón NMuMG el tratamiento con LIF inhibe en un 30% la incorporación de Timidina 3H . Estos datos muestran, por primera vez, que el LIF se expresa en la

mama normal y en neoplasias experimentales de ratón. Además, sugieren que este factor podría estar asociado a la involución que ocurre en el epitelio mamaro normal.

397. Expresión y localización de canales de agua permeables a urea y glicerol en sinciciotrofoblasto de placenta humana a término. Alicia Damiano^{1,2}, Elsa Zotta¹, Jorge Goldstein¹, Silvana Muzzolini¹, Alfred Van Hoek³, Claudia Silberstein¹ y Cristina Ibarra¹.

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, ²Laboratorio de Canales Iónicos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. ³Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.

En la placenta humana a término, el sinciciotrofoblasto (SCT), resultante de la fusión de las células del citotrofoblasto, es el responsable del intercambio de nutrientes entre la madre y el feto. Esto define que el transporte de metabolitos iones, y agua se realice primariamente por la vía transcelular. Las acuaporinas son proteínas integrales de membrana, permeables al agua y/o pequeños solutos. Este es el caso de la acuaporina tipo 3 (AQP3) y tipo 9 (AQP9), descritas como canales de agua, urea y glicerol en barreras epiteliales. Nuestro objetivo es investigar la presencia de estas acuaporinas en SCT. En este trabajo, informamos la expresión y localización de AQP3 y AQP9 en SCT, usando RT-PCR, inmunoblotting e inmunohistoquímica. Para ello se purificó ARN total de SCT y mediante la técnica de RT-PCR, se observó amplificación en la secuencia conservada NPA-NPA para los genes de AQP3 y AQP9. El análisis de Western blot utilizando anticuerpos anti-AQP3 y anti-AQP9 reveló en ambos casos una banda predominante de 27-28 kDa. El estudio inmunohistoquímico usando estos anticuerpos reveló marcación específica asociada con dominios de la membrana plasmática, mientras que en las áreas citoplasmáticas no se observó marcación. Como AQP3 y AQP9 permiten el rápido pasaje de agua, urea y glicerol, la presencia de estas proteínas en SCT, sugieren un rol de las mismas en el transporte de agua y solutos a través de la placenta humana.

ONCOLOGIA VI

398. Efecto de la radiación sobre la viabilidad y el metabolismo oxidativo de macrófagos alveolares. Deborah Tasat, Regina Mancuso y Beatriz Molinari.

Escuela de Ciencia y Técnica-Universidad de General San Martín. Radiobiología-Comisión Nacional de Energía Atómica. (tasat@cnea.gov.ar).

El efecto de la radiación gamma sobre la viabilidad y la funcionalidad celular en macrófagos alveolares (MA) es bien conocido. Los MA son más radioresistentes que otros tipos celulares, la fagocitosis no varía aún con dosis de hasta 100 Gy. No existen estudios sobre la respuesta de MA para radiaciones con iones pesados, actualmente utilizados en tratamientos oncológicos como la protonterapia. Cultivos de MA provenientes de ratas Wistar jóvenes (jo) y adultas (ad) se irradiaron con un haz de protones de 20.2 MeV (TANDAR-CNEA) con dosis de 10,25, 50,75,100 Gy. Se evaluaron: viabilidad celular, generación de anión superóxido y producción de nitritos 24 horas post irradiación. La viabilidad celular disminuyó para 25, 50 y 75 Gy en las dos poblaciones (jo = 92.4, 83,3 y 25,5% y ad = 73, 42, 12% respectivamente). La producción de nitritos (μM) aumentó significativamente en Majo para 10, 25, 50 y 75 Gy: 8.32 ± 0.01, 23.52 ± 0.01, 32.0 ± 0.01, 40.32 ± 0.01. En los MAad sólo las dosis mayores de 50 Gy produjeron un aumento significativo respecto de los controles. La fracción de células reactivas para la generación de O_2^- evaluado mediante el test de NBT para 50Gy fue de 0.34 y 1.2 en Majo y MAad respectivamente. Concluimos: 1) los Majo son más radioresistentes que los MAad respecto de la viabilidad celular 2) la

respuesta celular a la irradiación con protones varía según diferencias etarias.

399. Inestabilidad genómica nuclear y mitocondrial en cáncer de mama. Silvina Richard¹, Graciela Bailliet¹, Gerardo Páez¹, Martha Bianchi¹, Päivi Peltömäki², Néstor Bianchi¹.

¹Instituto Multidisciplinario de Biología Celular-La Plata-Argentina. e-mail: imbice@netverk.com ²Division of Human Cancer Genetics-The Ohio state University-Ohio-USA.

El objetivo de este trabajo es analizar la presencia de inestabilidad genómica mitocondrial (IGMt) y nuclear (IGN) en 40 pares de muestras de tejido normal /tumoral en pacientes con cáncer de mama. La IGMt fue analizada a partir de dos regiones polimórficas ubicadas en el asa D mitocondrial: un microsatélite (mtMS) (CA)_n entre los nt.514-524 y cuatro sitios de digestión para la enzima *MnI* (CCTC) N_n entre los nt. 16108-16420. Para la IGN se estudiaron 8 microsatélites dinucleotídicos (CA)_n ubicados en el brazo largo del cromosoma 13. El 47.5% (19/40) de los pares de muestras, mostraron mutaciones para los sitios *MnI*, representando un incremento de 216 veces con respecto a la velocidad de mutación espontánea de la línea germinal, estudiada en 459 eventos meióticos en familias del CEPH. El mtMS presentó inestabilidad en un 42.5% (17/40) de las muestras, un incremento de 16 veces con respecto a la velocidad de mutación espontánea. Se encontró IGN en el 50% (20/40) de los casos. El análisis de la correlación entre las IGMt e IGN demostró que son eventos independientes. Se propone que la IGMt se origina por dos principales mecanismos el daño por radicales libres y errores de reparación generados por la polimerasa gama.

400. Efecto sobre la reactividad y funcionalidad del anticuerpo monoclonal murino FC-2.15 mediado por la eliminación del epítopo alfa-gal de su estructura glicosilada. Mariana Capurro*, Cynthia López Haber*, Ramiro Pisonoy*, Laura Bover*, Leticia Macchiavelli* y José Mordoh*.

Instituto Leloir, "Fundación Campomar", Centro de Investigaciones Oncológicas CIO-FUCA, Buenos Aires, Argentina.

El anticuerpo monoclonal murino (AMC) FC-2.15 reconoce el antígeno Lewis X (LeX) en leucocitos PMN y tumores epiteliales humanos. Se utilizó en ensayos clínicos, siendo una limitación de su aplicación el desarrollo de respuesta HAMA (human anti-murine antibody) y los bajos niveles de AMC en suero. In vitro (FC-2.15 induce la agregación homotípica de PMN o heterotípica cuando estos son incubados con células MCF-7, y la lisis de los mismos es mediada por complemento humano. En un sistema de circulación sanguínea ex vivo se demostró que FC-2.15 induce aglutinación de PMN pero no su lisis. El objetivo de este trabajo es analizar la reactividad y funcionalidad del AMC FC-2.15 al eliminar el epítopo alfa-gal de su estructura glicosilada. La oxidación de FC-2.15 con periodato de sodio 10 mM: a) inhibió (100%) el reconocimiento del alfa-Gal por la lectina específica (*Bandeiraea simplicifolia*); b) produjo un aumento del 25 % en la reactividad medida por ELISA de FC-2.15 con extractos de PMN o células MCF-7; c) inhibió la capacidad lítica del AMC pero no la aglutinación de PMN. Cuando se utilizó FC-2.15 (5 a 20 ug/ml) digerido con alfa-galactosidasa se observaron en cambio niveles de lisis de PMN o MCF-7 comparables a los del control sin digerir, al igual que los valores de aglutinación. Dicha digestión disminuyó solo un 20% la reactividad de FC-2.15. Los niveles de HAMA en los sueros de los pacientes tratados con FC-2.15 disminuyeron cuando los sueros se enfrentaron con el AMC oxidado o digerido. Podemos concluir que la digestión de FC-2.15 con alfa-galactosidasa no impide la fijación de los factores de complemento, permitiendo la conservación de su efecto lítico, esencial para su utilización en ensayos clínicos.

401. ¿Es necesaria la radiografía de torax de rutina en los pacientes neutropenicos febriles?. Alfredo Navigante, Leandro Cerchiatti, Patricia Costantini, Monica Castro, Maribel Lutteral, Maria Cabalar, Javier Castillo. Instituto Angel Roffo.

Universidad de Buenos Aires.
e-mail: lccerchi@intramed.net.ar

Debido a la ausencia de síntomas en los pacientes neutropenicos febriles (NF), la RxTx realizada al momento de la admisión es una conducta rutinaria. Se evaluaron 90 admisiones consecutivas de pacientes con NF post quimioterapia citotóxica para determinar el redito diagnóstico para neumonía de la RxT rutinaria. Tenían tumores sólidos 66 ptes, mientras que 24 presentaban una neoplasia hematológica. El promedio de neutrofilos/mm³ al momento del ingreso fue 387 +/- 234. Veintiocho (31,1%) pacientes fueron considerados de bajo riesgo (clasificación modificada de Talcott) y 62 (69,9%) de alto riesgo. Los resultados de las RxT fueron correlacionados con la presencia o ausencia de síntomas y signos de infección respiratoria baja. De las 90 RxT, 27 (30%) resultaron anormales: 15 con enfermedad neoplásica conocida y 12 con infiltrados neumónicos. Nueve pacientes con neumonía en la RxT eran sintomáticos. Por lo tanto, solo 3 (3,3% - IC: 0 a 7%) de 90 pacientes presentaban infiltrados neumónicos en la RxT no sospechados por los signos o el examen físico. A ningún paciente se le modificó el esquema antibiótico empírico en base a los hallazgos radiográficos exclusivamente. En conclusión la RxT rutinaria al momento de la admisión en pacientes NF asintomáticos es innecesaria, independiente del riesgo de neutropenia.

402. Efecto inhibitorio del Factor de Transformación-β2 (TGF-β2) proveniente de líquidos quísticos (LQ) sobre células tumorales mamarias humanas MCF-7. Pablo Enríoz¹, Stella Vázquez¹, Carlos Fischer², Jorge Gori², Alberto Etkin³, Ricardo Calandra^{1,4}, Isabel Lüthy¹.

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental, ²Hospital Alemán, ³Hospital Durand, Buenos Aires, ⁴Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata,

La enfermedad macroquística mamaria es una patología benigna, que estaría asociada con un aumento del riesgo de desarrollar un carcinoma mamario (Cancer Res. 52:1791, 1992). Previamente hemos descrito que líquidos provenientes de quistes mamarios humanos (LQ) son capaces de promover la proliferación de células de cáncer de mama humano MCF-7, sin embargo algunos LQ produjeron inhibición de dicho crecimiento (SAIC,1999).El objetivo del presente trabajo fue estudiar la probable presencia de algún factor en los LQ que inhiba la proliferación de la línea MCF-7. Para ello se incubaron las células en presencia de TGF-β2 o LQ y además se determinó la concentración de dicho factor en los LQ por ELISA (ng/ml). La concentración de TGF-β2 fue significativamente menor en los 24 LQ tipo I (2,56 ± 0,739, que estimularon la proliferación 2,3 ± 0,3 veces) que en los 17 de tipo II (40,87 ± 5,92 que estimularon 0,9 ± 0,1 veces), p<0,0001. La concentración de TGF-β2 correlacionó negativamente con la proliferación celular (coeficiente de correlación de Spearman -0.795, p<0,0001). La incubación de las células con 0,8–20 ng/ml TGF-β2 produjo inhibición significativa de las células MCF-7 (0,8 ng/ml: 58.4 ± 1.8 % de incorporación de timidina-³H vs. control). Estos resultados sugieren que el TGF-β2 sería uno de los factores inhibitorios involucrados en la proliferación celular en LQ.

ENDOCRINOLOGIA V

403. Glicosilación no enzimática de la matriz extracelular: efectos sobre el crecimiento osteoblástico. Antonio McCarthy, Susana Etcheverry, Ana Cortizo.

Bioquímica Patológica. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. e-mail: mccarthy@biol.unlp.edu.ar.

La acumulación tisular de productos de glicosilación no enzimática (glicación) avanzada de proteínas (PGA), se ha asociado al desarrollo y progresión de complicaciones crónicas en pacientes con Diabetes mellitus. En este trabajo estudiamos el efecto de los PGA formados *in vitro* en una matriz de colágeno de tipo I (Col-I), sobre la adhesión, proliferación (recuento celular) y diferenciación (actividad de fosfatasa alcalina) de dos líneas osteoblásticas en cultivo: MC3T3E1, células no transformadas derivadas de calvaria de ratón; y UMR106 obtenidas de un osteosarcoma de rata. La presencia de PGA en un gel de Col-I, sobre el que se plaquearon los osteoblastos, inhibió la adhesión de las células tumorales (35±5% basal, $p < 0.001$), y aumentó la adhesión de las células no transformadas (262±29% basal, $p < 0.001$), respecto del gel control. La matriz glicada indujo además una disminución en la proliferación de ambas líneas celulares (56-59% basal, $p < 0.001$), pero sólo provocó una modificación significativa en la actividad específica de fosfatasa alcalina en las células de osteosarcoma (86±4% basal, $p < 0.05$). Estos resultados sugieren que la glicación excesiva del colágeno de tipo I (proteína predominante en la matriz extracelular ósea) podría interferir con el crecimiento osteoblástico, uno de los eventos involucrados en el proceso de formación ósea.

404. Participación de receptores serotoninérgicos y adrenérgicos en la modulación de la esteroidogénesis en células de Leydig del hamster dorado. Mónica Frungieri^{1,2}, Karina Zitta¹, Silvia Gonzalez-Calvar^{1,2}, Ricardo Calandra^{1,3}.

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental-Conicet; ²Cátedra Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA; ³Cátedra de Endocrinología, Facultad de Cs Exactas, UNLP.

Trabajos previos describen la presencia de norepinefrina (NE), epinefrina (E) y serotonina en el testículo, y su participación en la regulación de la producción de testosterona (T) (Frungieri y col. Neuroendocrinology, 1999). El objetivo de este trabajo fue avanzar en el estudio de la regulación heteróloga entre los receptores de E/NE y serotonina (5HT) en células de Leydig purificadas provenientes de hamsters adultos en fotoperíodo normal. Se determinó la producción *in vitro* de T en presencia de hCG 100 mUI/ml (29.4±1.3 ng/10⁶ cél Leydig), con o sin 10⁻⁶M de 5HT, E, NE y agonistas (ag) / antagonistas (ant) de sus receptores en el medio de incubación. Se halló que 5HT y ags 5HT1A/2A inhiben; mientras que, E/NE y ags $\alpha 1/\beta$ estimulan la producción de T. Ketanserina (ant 2A) revierte la acción de: 5HT (5HT: 21.9±1.1 vs 5HT+ket: 26.9±1.0*), ag 2 (DOI: 21.8±1.3 vs DOI+ket: 30.2±1.4*), ag β (isoproterenol: 36.4±0.8 vs iso+ket: 29.4±2.4*), y ag $\alpha 1$ (fenilefrina: 37.0±0.3 vs fen+ket: 31.9±1.1*). Sin embargo, pMppi (ant 1A) revierte la acción de 5HT (5HT: 21.9±1.1 vs 5HT+pMppi: 25.5±0.5*) y del ag 1A (DPAT: 22.5±1.5* vs DPAT+pMppi: 29.8±0.7*), pero no altera la respuesta a ags $\alpha 1/\beta 1$ (ng/10⁶ cél Leydig; *: $p < 0.05$). Estos resultados confirman que, la modulación en la producción de T en el testículo del hámster, ejercida a través de receptores $\alpha 1/\beta 1$, es mediada por receptores 5HT2A; mientras que no involucra la participación del sistema de receptores 5HT1A.

405. Detección inmunohistológica de adrenomedulina en insectos. Jorge Ronderos*, Alejo Scarano*, Frank Cuttitta+, Alfredo Martinez+.

*Cát.Histol.yEmbriol."B"-FCM-UNLP. + National Cancer Institute, NCI-NIH, USA - jrondero@museo.fcnyml.unlp.edu.ar

Adrenomedulina es un polipéptido recientemente aislado a partir de extractos de un tumor de glándula adrenal y caracte-

rizado originalmente por su función hipotensiva. El estudio de la misma se ha centrado hasta el momento principalmente en especies de vertebrados y su presencia y actividad no ha sido aun objeto de estudio en insectos. En el presente trabajo reportamos la detección de material inmunorreactivo para un antisuero antiadrenomedulina en tejidos de larvas del mosquito *Culex pipiens* L. Larvas de IV estadio fueron obtenidas a partir de una colonia artificial y procesadas para análisis histológico. Se realizaron inmunomarcaciones con peroxidasa directa mediante la utilización de un antisuero contra AM (1/500) desarrollado en conejo. Como control se realizó el mismo procedimiento reemplazando el antisuero primario por suero normal de conejo. Los resultados muestran la presencia de material inmunorreactivo en el tubo digestivo (TD) y sistema nervioso (SN). La distribución intracelular en las células del TD es citoplasmática al igual que en el SN, donde ha sido detectada en cuerpos neuronales del cerebro así como en axones de los ganglios torácicos. La presencia en tubo digestivo sugiere una acción reguladora del proceso digestivo, mientras que en SN podría estar asociada a procesos de regulación neuroendócrina.

406. Efectos receptoriales y extrareceptoriales de un agonista GnRH de acción prolongada sobre la liberación y síntesis de LH hipofisaria. Sergio Justo y Graciela Rossano.

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. e-mail sjusto@arnet.com.ar

La administración prolongada y continua de agonistas de GnRH suprime la respuesta hipofisaria de LH a la administración de GnRH. Con el objeto de aclarar el mecanismo de acción antagonista de un agonista GnRH de acción prolongada, se administró por vía s.c. una dosis (90 ug) de Acetato de Leuprolida de depósito a ratas hembras adultas normales. A los 7, 14, 21 y 28 días de la inyección se les realizó una prueba de estimulación con GnRH natural por vía i.v. Se evaluó LH sérica antes y después de la prueba y su contenido hipofisario por radioinmunometría. Los resultados muestran: a) LH (ng/ml) antes de la prueba más alta a los 7 y 14 días en las ratas tratadas (T) que en las ratas controles (C). 7d T: 32.6±6.6; C: 10.9±0.8 (P 0.01) 14d T: 19.8 ±2.3; C: 10.5±1.2 (P < 0.007) sin diferencias significativas a 21 y 28 días. b) no respuesta a la prueba de GnRH en los animales tratados en todos los tiempos T: 36.2±4.2; C: 187.0±15.2 (P < 0.0001). c) pesos ováricos (mg) menores en los tratados T: 24.8±2.0; C: 57.5±2.7 (P 0.0001). d) menor contenido de LH hipofisaria en tratados, 7d T: 61.8±7.5; C: 713.9±37.8 (P < 0.0001) 14d T: 101.5±23.0; C: 683.0±117 (P < 0.001). Se concluye que además de los efectos receptoriales, están involucrados efectos genómicos directos e indirectos (disminución de los esteroides sexuales) que participan en la síntesis de los componentes de la molécula de LH.

407. Rol de la sensibilidad a la insulina (SI) y del IGF-1 sérico en la síntesis de andrógenos adrenales (AA) en niños normales prepúberes (Pp) y puberales (Pu). Gabriela Guercio, Eduardo Chaler, Mercedes Maceiras, Diego Chirico., Luis Del Rio, Marco Rivarola, Alicia Belgorosky.

Serv. Endocr. y Lab. Química, H. Garrahan, Bs. As., Arg. e-mail: abelgo@elsitio.net

El IGF1 y la Insulina (INS) incrementan la expresión de los RNAm de 3B HSD tipo II y P450c17 en tejidos esteroideogénicos. En este estudio se evaluó el rol del IGF1 sérico y de la SI (Índice Glucemia/Insulina, inG/I) en la síntesis de AA en 56 varones normales Pp y Pu con edad cronológica (EC) de 1.2 a 16.6 años. Se definieron 2 grupos (Gr): Gr1 (Volumen testicular, VT < 4ml, n=33) y Gr2 (VT ≥ 4ml, n=23). El Gr1 fue subdividido en función de la mediana de EC (5.9 años) en menores (Gr1A, n=16) y mayores (Gr1B, n=17) y el Gr2 en función del VT en Gr2A: VT entre 4-8 ml (n=13) y Gr2B: VT > 8

ml, n=10. También se evaluó Gr1B+ Gr2A (Gr3, n=30). El SDHEA y la delta Δ del suero fueron más altos en el Gr2 que en el Gr1 ($p < 0.0001$). Con la EC se halló una correl. positiva signif. con el SDHEA en el Gr1 y Gr3 y con delta Δ en el Gr2, Gr2B y Gr.3. El inG/I fue más alto en el Gr1 (35.9 ± 19.7) que en el Gr2 (11.5 ± 5.0 , $p < 0.0001$) y fue similar en Gr1A y B y en Gr2 A y B. Se halló una correl. neg sig. del inG/I con EC, SDHEA y delta Δ sólo en el Gr3. El IGF-1 sérico correlacionó neg con el inG/I en el Gr1 y Gr3 y no se halló correl sig con los AA. Conclusiones: En la Pp la síntesis de AA sería secundaria a cambios madurativos intraadrenales mientras que la INS ejercería un rol regulatorio en la Pu. El eje GH-IGF-1 podría ejercer un rol regulatorio sobre la SI y condicionar el cambio observado en la Pu temprana.

408. Expresión del ARNm de IGF I y del receptor (Rc) de IGF tipo I en tejido adrenal humano prepúber (TAHP).

Andrea Dardis, Adriana Jager, Marco A. Rivarola, Alicia Belgorosky.

Laboratorio de Investigación, Hospital de Pediatría Garrahan. (Fax: 4308-5325)

Existe escasa información acerca de la expresión de IGF I y del Rc de IGF tipo I en la glándula adrenal humana durante la prepubertad. El objetivo de este estudio fue analizar la abundancia del ARNm de IGF I y del Rc de IGF tipo I en 11TAHP (rango: 0.48-15 años) en función de la edad cronológica (EC). La metodología fue RT-PCR semicuantitativa, coamplificando en fase exponencial por un lado el cDNA de IGF I y B actina; y por otro el cDNA del Rc de IGF tipo I y B actina. Los resultados se expresaron como la relación IGF I/B actina y Rc de IGF tipo I/B actina. Se halló una correlación negativa y significativa entre la abundancia del ARNm de IGF I y la EC ($r = -0.65$, $p = 0.03$), mientras que se halló una correlación positiva y significativa entre la abundancia del ARNm del Rc de IGF tipo I y la EC ($r = 0.78$, $p = 0.004$). Se halló una correlación negativa entre la abundancia de ambos ARNMs analizados ($r = 0.65$, $p = 0.02$). Se concluye que el ARNm de IGF I y el ARNm del Rc de IGF tipo I se expresan en el TAHP. La correlación negativa entre la abundancia de ambos ARNMs sugiere que en el TAHP el IGF I podría ejercer un efecto inhibitorio sobre la expresión del Rc de IGF tipo I, como ha sido observado en otros tejidos. Dado que ha sido descrito un mayor número de Rc de IGF tipo I en la zona reticularis, el aumento de la abundancia de este ARNm en función de la EC podría ser atribuido al incremento del número de células de la zona reticularis durante el período prepuberal.

409. Síntesis de aldosterona en linfocitos periféricos de pacientes con déficit de 21-hidroxilasa. Daniela Rogoff (1), Celso Gómez-Sánchez (2), Marta Barontini (1)

(1) Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Buenos Aires, Argentina. (2) University of Mississippi Medical Center, Jackson MS, USA. e-mail: cedie@cedie.guti.gov.ar

El bloqueo de la 21HO es la causa más frecuente de hiperplasia suprarrenal congénita (HSC). Se ha visto que algunos pacientes con la forma perdedora de sal (PS) mejoran su capacidad retentora de sodio y aumentan los niveles de aldosterona (A) con la edad. La presencia de actividad 21HO ha sido demostrada en diversos tejidos extraadrenales, incluyendo linfocitos, aún en pacientes con HSC. Por otro lado, se ha demostrado que la 21-deoxialdosterona (21-deoxiA), un precursor en la síntesis de A, se encontraría elevada en pacientes con HSC-21HO. **Objetivo:** estudiar la conversión de 21-deoxiA en A en linfocitos de pacientes con HSC. **Sujetos y métodos:** se estudiaron 3 pacientes con HSC-PS (8,2, 14,8 y 15,7 años) y 3 controles (adultos). Se aislaron linfocitos de sangre periférica y se incubaron durante 24hs con 21-deoxiA tritiada. La A marcada fue medida en el medio de cultivo luego de extracción y separación por TLC. **Resultados:** se observó similar porcentaje de conversión de 21-deoxiA en A en

los controles (entre 10.8 y 15.5%) y en los pacientes con HSC (entre 10 y 16%) **Conclusiones:** La demostración de 21 hidroxilación extraadrenal de la 21-deoxiA en A en pacientes con HSC PS sugiere que la 21-deoxiA, que estaría en exceso en esta patología, podría ser la fuente de A en estos pacientes.

410. Efecto de la Gonadotropina Coriónica humana (hCG) sobre el intersticio testicular de la rata inmadura. Disociación entre diferenciación citológica y respuesta funcional. Mariana Musse, Héctor Chemes.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños. e-mail: hchemes@cedie.guti.gov.ar

En el intersticio testicular de la rata inmadura se observa un tipo especial de células de Leydig llamadas fetales (CLF) que se su- pone desaparecen con la maduración y que no sufren el fenómeno de desensibilización característico de las células de Leydig adultas. El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del tratamiento con hCG sobre la población de CLF y la respuesta funcional de este intersticio testicular. Ratas de 9 días recibieron hCG (vía SC, 14-20 UI/animal/día) por 10 días, y los controles (C) solución salina 0,9%. Se determinó el porcentaje de CLF (sobre el total de células de Leydig) y se realizó la incubación in vitro con hCG (3 hs, 20 ng/ml). La significación de los resultados ($X \pm DS$) se expresa como $p < 0.001$. El peso testicular (PT, mg/g) y la testosterona sérica (TS, ng/ml) aumentaron con el tratamiento (PT: C $1,9 \pm 0,1$ vs hCG $2,7 \pm 0,3$, TS: C $0,7 \pm 0,2$ vs hCG $9,8 \pm 1,9$). En ratas controles la producción de T (ng/testic) bajo estímulo in vitro con hCG se elevó sobre el basal (B: $0,8 \pm 0,7$; hCG: $3,6 \pm 2,1$), mientras que en las ratas inyectadas con hCG la reestimulación no elevó los basales (B: $12,2 \pm 5,1$; hCG: $12,5 \pm 2,8$ NS). Las CLF aumentaron con el tratamiento (C: $55,3\% \pm 2,8$; hCG: $88,6\% \pm 6,1$). Se concluye que la estimulación con hCG induce en ratas inmaduras una respuesta funcional de tipo adulto con desensibilización. El predominio de CLF en estos animales indica una disociación entre su fenotipo citológico (fetal) y su respuesta desensibilizada, y cuestiona la validez de la división de células de Leydig en fetales y adultas.

411. Regulación por fosfolipasa A₂ (PLA₂) de la actividad de láctico deshidrogenasa (LDH) y de la incorporación de 2-deoxiglucosa en células de Sertoli. Gabriela Gómez, Silvana Meroni, Fernanda Riera, Eliana Pellizzari, Helena Schteingart, Selva Cigorraga.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños "R. Gutiérrez". Buenos Aires. e-mail: scigorraga@cedie.guti.gov.ar

La célula de Sertoli se encuentra regulada por FSH, testosterona y péptidos de producción local. Varios de estos péptidos, incluyendo la FSH, podrían utilizar la activación de PLA₂ para iniciar la compleja cascada de señales involucrada en la respuesta biológica. En trabajos anteriores (SAIC 99) analizamos el efecto de PLA₂ (10UI/ml) y ácido araquidónico (30uM) sobre la funcionalidad de las células de Sertoli. Se comprobó que PLA₂ y ácido araquidónico estimulaban la producción de lactato. El objetivo de este trabajo fue analizar los posibles mecanismos involucrados. Cultivos de células de Sertoli de ratas de 20 días de edad fueron estimulados con PLA₂ (10UI/ml) y se determinó la capacidad de incorporar 2-deoxiglucosa (2-DOG) a la célula y la actividad de LDH. Se realizaron incubaciones durante 48 y 72 horas respectivamente obteniéndose los siguientes resultados; incorporación 2-DOG: Basal 967 ± 17 , PLA₂ $1773 \pm 131^*$ dpm/ugDNA y LDH: Basal 24.7 ± 1.8 , PLA₂ $40.9 \pm 2.7^*$ mUI/ugDNA, media \pm DS, n=3, * $p < 0.001$ vs basal. Se realizó una curva de tiempo (30, 60, 120, 240 minutos) para la acción de PLA₂ observándose máxima incorporación de 2-DOG a los 60 minutos. Los resultados

obtenidos sugieren que en células de Sertoli, PLA_2 regula la producción de lactato estimulando la incorporación de glucosa a la célula y aumentando la actividad de LDH.

412. Actividad de la Oxido Nítrico Sintasa (NOS) en células de Leydig de rata y glándula adrenal bovina.

Cecilia Reche¹, José Sainz², Zoraida Patrignani¹, Carolina Mondillo¹, Omar Pignataro¹.

¹Lab de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales. Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET. Buenos Aires. Argentina. ²Depto de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad del País Vasco. Bilbao. España.

Resultados previos mostraron que el óxido nítrico (NO) es un modulador de la esteroidogénesis en testículo, ovario y adrenal. La formación de NO, a partir de arginina (Arg), en los distintos sistemas es catalizada por la NOS (formándose citrulina, Cit, como coproducto), de la cual se han identificado tres isoenzimas: NOS I (nNOS), NOS II (iNOS) y NOS III (eNOS). Las isoformas I y III son calcio-dependientes. **Objetivo:** En este trabajo se caracterizó la actividad de la NOS en los siguientes modelos experimentales: células de Leydig de rata (Ley) y células de la zona glomerulosa (CG) y de la zona fasciculada-reticular (CF) de glándula adrenal bovina. Se midió la conversión de [³H]-L-Arg a [³H]-L-Cit a 37°C y el producto se separó mediante la resina AG 50W X8, forma hidrógeno. **Resultados:** En los tres sistemas la reacción siguió una cinética de Michaelis con los siguientes parámetros: Ley: Km (μ M L-Arg)=0,65, Vmax (pmol L-Cit/mg prot min)=3,9; CG: Km=18,4 Vmax=16,7; CF: Km=16,8, Vmax= 25,6. La actividad enzimática fue dependiente de NADPH y máxima a 0,3 mM del cofactor. Análogos estructurales de L-Arg: L-NAME y L-NMMA inhibieron la actividad de la NOS de modo dosis-dependiente. En presencia de EGTA 5 mM en el medio, la actividad de la NOS fue completamente inhibida, demostrando así que la enzima es calcio dependiente. **Conclusión:** La presencia de la NOS en los 3 sistemas esteroidogénicos, apoya las evidencias que el NO puede actuar como un regulador autocrino y/o paracrino. (Subsidios: BID 802 OCAR-PICT/97-0440-ANPCYT y PIP 1004/98-CONICET).

413. Crecimiento y desarrollo de ratones 'little' evaluados con la función de J. Parks, de crecimiento y alimentación. Rodolfo Puche, Gustavo Chapo y Rosa Alloatti.

Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Ciencias. Médicas, Rosario. e-mail: rpuche@unrctu.edu.ar

Este trabajo analiza el crecimiento de ratones macho C57BL/6, hetero (lit/+) y homocigotas (enanos, lit/lit), en el período 4 a 15 semanas de edad. La hipófisis y el plasma de los ratones lit/lit es deficiente en hormona de crecimiento (HC). El crecimiento se evaluó mediante una teoría (J. Parks) que define el crecimiento en función del alimento consumido acumulado, cinética del apetito y conversión de alimento en biomasa. Comparando variables vitales de los ratones lit/+ vs. lit/lit, éstos últimos tienen menor peso maduro (29.0±2.0 g, 18.0±3.1 g, P=0.007), consumo maduro (28.0±2.2 g/sem, 15.0± 4.2 g/sem, P=0.02), y conversión de alimentos en biomasa al inicio (4ª semana) del estudio (0.316 vs. 0.215, P = 0.015). Los ratones lit/lit requieren más tiempo que los lit/+ para alcanzar el 63% del consumo maduro (Constante de Brody: 2.2 vs. 1.0 semanas, P=0.0006). La ausencia de HC impone a estos ratones el defecto crónico de su actividad lipolítica. La eficiencia de conversión de alimento de los ratones lit/lit, en lugar de decaer exponencialmente en función de la edad, decae hasta la 7ª semana de vida y después permanece constante. El crecimiento en peso no decae después de las 15 semanas de edad. A las 40 semanas los ratones lit/lit son notoriamente obesos y sedentarios, pesan (34.4±1.6 g) más que los lit/+ de la misma edad (30.0±1.5 g, P = 0.0462).

414. Peso de testículo y epidídimo y valores de testosterona plasmática en ratas de las líneas diabéticas eSS y eSMT. Noriyuki Hisano, Lisandro Vettorello, Fernando Vignoni, Catalina Dorigo, Ana Frontini, Alberto D'Ottavio, María Tarrés, Silvana Montenegro, Stella Martínez.

Cátedras de Histología y Embriología y de Biología, Facultad de Ciencias Médicas y Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario. e-mail: stellamartinez@mcg.org.ar. (Presentado por Sara W-Jairala)

El objeto de este trabajo fue iniciar el estudio de posibles alteraciones del tracto reproductivo masculino en eSS y eSMT, líneas endocriadas de ratas con diabetes espontánea tipo 2. eSMT deriva de eSS y presenta hiperglucemias más intensas y precoces que eSS. Se sacrificaron 14 machos eSS, 15 eSMT y 12 controles eumetabólicos línea Wistar (W) de 3, 7 y 12 meses. Se registró el peso, absoluto y relativo a la biomasa, de testículo y epidídimo (izquierdo, derecho y peso conjunto). El peso del testículo fue menor en eSS y eSMT que en los testigos a los 7 (P<0.001) y 12 meses (P<0.05). Respecto del epidídimo fue menor en las líneas diabéticas a los 7 meses (P<0.01). No se verificaron diferencias entre el peso de dichos órganos, izquierdo o derecho (P>0.05). Los pesos de testículo y de epidídimo fueron más bajos en las ratas eSMT a los 7 y 12 meses. Valores de 12 meses expresados como promedios ± desvío estándar: a) Peso de ambos testículos: eSMT: 1.98±0.85g vs eSS: 2.68±0.13g vs W: 3.22±0.62g; P<0.05. b) Peso de ambos epidídimos: eSMT: 0.85±0.32 vs eSS: 1.2±0.04 vs W: 1.23±0.26, P<0.05). Antes de sacrificar los animales, se dosó testosterona plasmática. Los valores (promedio ± desvío estándar, ng/ml) fueron menores en los machos eSMT de 7 (eSMT: 1.14±0.81 vs eSS: 2.034±0.88 vs W: 3.91±0.09, P<0.01) y de 12 meses (eSMT: 0.56±0.81 vs eSS: 2.54±1.97 vs W: 3.08±1.17; P<0.05). Estos datos sugieren que ambas líneas diabéticas, particularmente eSMT, podrían presentar alteraciones de la función gonadal asociadas al menor peso de sus órganos reproductivos y a los menores valores de testosterona.

FARMACOLOGIA II

415. El tratamiento de células nerviosas con aluminio modifica la actividad y expresión de óxido nítrico sintetasa. Carlos Lafourcade, Graciela Garbossa, Claudia Pérez Leirós, Alcira Nesse.

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires-CONICET. (charly@qb.fcen.uba.ar)

La exposición al ion aluminio (Al) produce efectos neurotóxicos en humanos. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a la toxicidad por Al son desconocidos, sugiriéndose que podrían estar involucradas reacciones por radicales libres. En tal sentido, se ha observado que el Al tiene un efecto inhibitorio sobre la inducción de LTP en el área CA3 de hipocampo, siendo esta inhibición antagonizada por la vía del óxido nítrico. Nuestro objetivo es investigar el efecto del Al sobre la expresión y actividad de las isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS) en células nerviosas. Para esto se cultivaron células de neuroblastoma humano SHSY5Y durante cuatro días con 0.1 mM de $AlCl_3$; midiéndose la expresión de la enzima por inmunoblotting, así como su actividad usando ($U-^{14}C$)-arginina como sustrato. Nuestros resultados muestran una disminución de la actividad de NOS en las células cultivadas con Al (X±ES: control: 1,31±0,01, Al: 1,12±0,01, p<0,01), pudiendo comprobarse por inmunoblotting que la disminución obedece a cambios en la expresión de la isoforma neural de NOS (nNOS), no obser-

vándose cambios en la isoforma inducible (iNOS). En base a estos resultados concluimos que el AI produce una disminución en la expresión y actividad de nNOS sin modificar la de iNOS en estas células.

416. Comportamiento farmacocinético de aniones orgánicos (Bromsulfoftaleína, BSF y Sulfanilamida, SA) en ratas tratadas con Vitamina D₃. Nora Quaglia*, Jorgelina Cerrutti y Adriana Torres.

Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. CONICET. () Farmacología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Email: adtorres@fbiof.unr.edu.ar.*

Ratas tratadas con vitamina D₃ presentaron alteraciones en la depuración de drogas. **Objetivos:** comparar la farmacocinética de SA y BSF, aniones orgánicos modelo, con prevalente excreción renal y hepática respectivamente, en ratas tratadas con vitamina D₃. **Metodología:** Se trabajó con ratas controles (C) y tratadas con Vitamina D₃ (300000 UI/kg p.c., i.m.; 5 días previos al experimento, T). Se evaluaron los parámetros farmacocinéticos luego de una dosis de SA (0.4 mg/kg p.c., i.v.) ó de BSF (1.26 mg/kg, p.c., i.v.). Se determinaron niveles de calcio en plasma, aorta (Caa), riñón (Car) e hígado y flujos sanguíneos renal (FSR) y arterial hepático (FAH). **Resultados:** (* p<0.05.): Clearance BSF (ml/seg/100 g p.c.): C: 0.019 ± 0.001, T: 0.029 ± 0.001*; SA (ml/min/100 g, p.c.): C: 2.66 ± 0.17, T: 3.19 ± 0.09*, Constantes de velocidad de eliminación: BSF (seg⁻¹): C: 0.0060 ± 0.0003, T: 0.0083 ± 0.0004*; SA (min⁻¹): C: 0.060 ± 0.0028, T: 0.072 ± 0.0022*, Caa (umol/g): C: 24 ± 2, T: 38 ± 5*; Car (umol/g): C: 11 ± 0.22, T: 13 ± 0.4*; FSR (ml/min/100g, p.c.): C: 5.3 ± 0.7, T: 3.2 ± 0.3*; FAH (ml/min/100 g, p.c.): C: 0.19 ± 0.02, T: 0.14 ± 0.02. **Conclusiones:** en las ratas tratadas, existe un aumento del clearance sistémico para ambos aniones, justificado por un incremento en sus respectivas constantes de velocidad de eliminación. Las variaciones de flujo de los respectivos órganos excretores no explicarían estas diferencias.

417. Influencia del sexo sobre la depuración sistémica y renal de furosemida (FS) en ratas. Jorgelina Cerrutti*, Anabel Brandoni, Nora Quaglia y Adriana Torres. Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. CONICET.

() Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. Email: adtorres@fbiof.unr.edu.ar*

Se ha demostrado que el ácido paraaminohipúrico presenta menor depuración sistémica y renal en ratas hembras. El objetivo de este trabajo fue evaluar si se observa diferencia ligada al sexo en el comportamiento farmacocinético y en la depuración renal de FS. **Metodología: Farmacocinética:** Se administró a ratas Wistar de 120 días (♂, n=9; ♀, n=8) una dosis única de FS por vía endovenosa (10 mg/kg). Luego se tomaron muestras de sangre a distintos tiempos (0-120 min). Se demostró que la disposición de FS se ajusta a un modelo bicompartimental (PKCALC). **Clearance renal:** se utilizaron técnicas convencionales en ratas Wistar de 120 días (♂, n=6; ♀, n=6). **Resultados** (*p<0.05): Clearance sistémico (ml/min/100gr): ♂ = 0.344 ± 0.021; ♀ = 0.266 ± 0.005*. t_{1/2} (min): ♂ = 40.11 ± 2.51; ♀ = 61.88 ± 3.58*. Constante de velocidad de eliminación del compartimiento central (k₁₋₀, min⁻¹): ♂ = 0.041 ± 0.003; ♀ = 0.030 ± 0.001*. Constante de velocidad de distribución (min⁻¹): ♂ = 0.59 ± 0.13; ♀ = 0.22 ± 0.03*. Constante de velocidad de eliminación (min⁻¹): ♂ = 0.018 ± 0.001; ♀ = 0.011 ± 0.001*. Clearance renal (ml/min/100gr): ♂ = 0.295 ± 0.031; ♀ = 0.165 ± 0.012*. **Conclusión:** el menor clearance renal de FS determinaría una menor depuración sistémica de la droga en hembras. Se evidencia también una menor velocidad de distribución en este sexo.

418. Efecto de extractos de *Trichilia glabra* sobre la infectividad viral y la apoptosis inducida por distintos virus. Maximiliano Cella, Diego Riva, Patricia Gadaleta, Félix Coulombié, Susana Mersich.

Laboratorio de Virología. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. mcella@qb.fcen.uba.ar

Hojas secas de *Trichilia glabra* fueron sometidas a sucesivas extracciones con cloroformo y metanol, obteniéndose EM, extracto metanólico que luego se particionó con acetato de etilo (AcEt) y agua. La fracción AcEt se sembró en una columna de Silicagel de la que se eluyó con solventes de distinta polaridad, obteniéndose así el resto de las fracciones. Se ensayó *in-vitro* la actividad antiviral y virucida de las fracciones así obtenidas, en concentraciones no citotóxicas, contra los virus HSV-1 (virus herpes simplex), VSV (virus de la estomatitis vesicular) e Influenza. En ninguno de los casos se detectó actividad antiviral. Sin embargo se encontró un efecto virucida en todas las fracciones contra los virus HSV-1 y VSV, dependiente del tiempo de preincubación y de la concentración usada. Las concentraciones que bajan los títulos virales en un 50% estuvieron en el rango de 0,52 a 0,60 mg/ml para EM y de 0,27 a 0,41 mg/ml para las fracciones de elución. También se detectó actividad antiapoptótica cuando se pretrataron células Vero y MDCK con EM (0,17 mg/ml) y luego se infectaron con los virus VSV e Influenza respectivamente. La tinción con el colorante de Hoescht, permitió observar un retraso en la aparición de la morfología nuclear característica de la apoptosis inducida por ambos virus en las células pretratadas. Estos resultados sugieren una probable actividad de protección celular.

419. El nifurtimox forma peroxinitrito en microsomas de hígado de rata. Patricia Carrizo, Marta Dubin y Andrés Stoppani.

Centro de Investigaciones Bioenergéticas. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Fax: 54 11 45 08 36 80. e-mail: gcarrizo@arnet.com.ar

El nifurtimox (NFX), nitrofurano activo contra *Trypanosoma cruzi*, forma NO₂⁻ en microsomas hepáticos de rata incubados con NADPH en anaerobiosis. Para dilucidar los efectos citotóxicos del NFX y los procesos involucrados, se estudió la generación aeróbica de NO₂⁻, peroxinitrito (ONOO⁻) y anión superóxido (O₂⁻) en presencia de: NFX 0,2 mM, sistema generador de NADPH (NADP⁺ 0,55 mM; glucosa-6-P 5,5 mM; MgCl₂ 5,5 mM; glucosa-6-P deshidrogenasa 1,33 U/ml) y microsomas hepáticos (1 nmol citocromo P₄₅₀ (P₄₅₀/ml) en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4. La formación de NO₂⁻ se midió por la reacción de Griess; la generación de ONOO⁻ y O₂⁻, por la oxidación de la dihidrorodamina 123 y de la adrenalina, respectivamente. La producción de NO₂⁻, ONOO⁻ y O₂⁻ aumentó en función del tiempo de incubación, obteniéndose, (x±ESM; t=60 min; n=3) en presencia de NFX: 11,47±0,21 nmoles de NO₂⁻/nmol P₄₅₀ (P<0,001); 1,44 ± 0,08 nmol de ONOO⁻/ml (P<0,02) y 11,56±2,46 nmoles de O₂⁻ x (min x mg proteína)⁻¹ (P<0,001). Valores control hallados: NO₂⁻ no detectable; 1,09±0,13 nmol de ONOO⁻/ml y 2,23±0,08 nmoles de O₂⁻ x (min x mg proteína)⁻¹. En conclusión, el metabolismo hepático del NFX en aerobiosis estaría dado por la formación de NO₂⁻, O₂⁻ y ONOO⁻, moléculas muy reactivas, oxidantes y cuya presencia en la célula hepática sería una de las posibles causas de citotoxicidad.

420. Evaluación de la actividad relajante sobre el cuerpo cavernoso de Plantas Americanas. Oksana Hnatyszyn, Julia García, Valeria Moscatelli, Ana Balaszczuk, Cristina Arranz, Rubén Rondina, Graciela Ferraro, Jorge Coussio.

Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco, CONICET. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. E-mail: jcoussio@ffy.uba.ar

Las deficiencias en la erección peneana son debidas generalmente a fallas en la relajación del músculo liso del cuerpo cavernoso. Diferentes especies vegetales son utilizadas en la medicina folclórica en estas disfunciones. En la presente investigación se evalúa la actividad de extractos de 2 plantas medicinales sobre la relajación del citado músculo: *Turnera diffusa* Willd. (Turneraceae) y *Huperzia saururus* (Lam.) Trevis. (Lycopodiaceae), "cola de quirquincho". Infusiones de ambas son usadas en medicina popular como agentes estimulantes y afrodisiacos. Los extractos fueron testeados sobre el músculo liso del cuerpo cavernoso. El pene fue obtenido de cobayos de Guinea (450-650grs.) se los colocó en solución de Krebs con 95% de O₂/ 5% CO₂, después de 30 min. de período de estabilización se utilizó L-fenilefrina para ajustar el máximo de contracción. Se usó solución acuosa de 3 extractos de cada especie vegetal (infusión extracto metanólico y dclorometánico) y el efecto (cambios en la fuerza isométrica) se midió a los 5-7 min. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción de la contracción. **Resultados:** La relajación del músculo liso y los mejores resultados se obtuvieron con los extractos metanólico y dclorometánico de *T. d.* y *H. s.* (reducción > a 86% para una concentración de 10 mg./ml). Se continúa con la investigación en el aislamiento y determinación estructural de los compuestos activos.

421. Inhibición por retinoides de la sensibilización de las respuestas vasoconstrictoras por estímulo de los receptores a cininas B₁ en vena umbilical humana. Pablo Sardi, Verónica Rey-Ares, Virginia Pujol-Lereis, Rodolfo Rothlin.

III Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. (farmaco3@fmed.uba.ar)

En vena umbilical humana (VUH) hemos observado un proceso de *up-regulation* de los receptores a cininas B₁ con el tiempo de incubación (Sardi y col., *Eur.J.Pharmacol.* 1997, 321: 33-38). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *all-trans*-ácido retinoico (AR) y *9-cis*-AR sobre esta sensibilización. Se incubaron anillos de VUH en solución de Krebs a 37°C, pH 7.4. Luego de 5 horas se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) al agonista de los receptores B₁, des-Arg⁹-bradicinina (des-Arg⁹-BK). La exposición durante las 5 horas a *all-trans*-AR o *9-cis*-AR produjo un corrimiento significativo de las CCR a des-Arg⁹-BK, sin afectar la respuesta máxima (pCE₅₀, control: 7,41±0,11, n=9; *all-trans*-AR (0,1µM): 6,77±0,07, n=9, p<0,05, (1µM): 6,14±0,09, n=4, p<0,05; control: 7,53±0,10, n=7; *9-cis*-RA (0,1µM): 7,18±0,17, n=7, p<0,05, (1µM): 6,62 ± 0,10, n=6, p<0,05). Por otro lado, la incubación con ambos retinoides (1 µM) durante los últimos 30 minutos no produjo modificaciones de las CCR a des-Arg⁹-BK (pCE₅₀: control: 7,47±0,14, *all-trans*-AR: 7,46±0,23, n=5; control: 7,57 ± 0,17, *9-cis*-AR: 7,31 ± 0,16, n=6). Estos resultados indican que los retinoides inhiben el proceso de *up-regulation* de los receptores a cininas B₁ en la VUH. Considerando que estos receptores sufren *up-regulation* en procesos inflamatorios, esta acción inhibitoria de los retinoides podría participar en sus efectos antiinflamatorios.

422. Efecto de las citoquinas IL-4, TGF-beta1 e IL-6 sobre el fenómeno de *up-regulation* de los receptores a cininas B₁ en vena umbilical humana. Verónica Rey-Ares, Pablo Sardi, Eliana Marengo, Santiago Serrano, Manuel Wolfson, Rodolfo Rothlin.

III Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. e-mail: farmaco3@fmed.uba.ar

En vena umbilical humana (VUH) los receptores a cininas B₁ sufren un proceso de *up-regulation in vitro* que es potencia-

do por las citoquinas proinflamatorias interleuquina-1beta y factor de necrosis tumoral-alfa, como así también por lipopolisacárido. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de otras citoquinas sobre este fenómeno. Se emplearon anillos de VUH montados bajo tensión isométrica en solución de Krebs a 37°C, pH 7,4, burbujeados con carbógeno. Luego de 5 h se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) a des-Arg⁹-bradicinina (BK), agonista selectivo de los receptores a cininas B₁. En los tejidos expuestos a IL-6 durante las primeras 3 h se observó una significativa potenciación de la respuesta a des-Arg⁹-BK (pCE₅₀: control 7,66±0,07; tratado 7,93±0,06; n=6; p<0,05). Por otro lado, la exposición continua con IL-4 (10U/ml) o con TGF-beta1 (3ng/ml) produjo un efecto inhibitorio de las CCR a des-Arg⁹-BK (pCE₅₀: control 7,72 ± 0,08; IL-4 7,29 ± 0,13; n=5; p<0,05; pCE₅₀: control 7,64 ± 0,03; TGF-beta1 7,23±0,05; n=6; p<0,05). Por otro lado, IL-4 (10U/ml) y TGF-beta1 (3ng/ml) 30 min antes de la CCR, no modificaron las respuestas contráctiles a des-Arg⁹-BK. Estos resultados presentan evidencias adicionales que sugieren una posible relación entre las propiedades de las citoquinas tanto pro- como anti-inflamatorias y sus efectos sobre el fenómeno de *up-regulation* de los receptores a cininas B₁.

423. Nuevos anticonvulsivantes: cinética de oxcarbazepina y lamotrigina en terapia adjunta. Angélica Berellini¹, María Viola², Patricia Saldón¹, Modesto Rubio².

¹Servicio de Neurología, Hospital Ramos Mejía, Gobierno de la Ciudad. ²Cátedra de Farmacología, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA. (msviola@huemul.fyib.uba.ar).

Nuestro objetivo fue evaluar el perfil plasmático de la asociación oxcarbazepina (OCBZ) y lamotrigina (LMT), dos nuevos anticonvulsivantes, y compararlo con las asociaciones tradicionales de anticonvulsivantes, tipo inductores enzimáticos. Se consideraron para el análisis 163 muestras de pacientes con epilepsia, extraídas en ayunas antes de la próxima toma de la medicación, con por lo menos un mes de terapia. Las concentraciones plasmáticas se determinaron por HPLC. Se calculó el clearance plasmático de LMT (Cl_{LMT}) y del metabolito monohidroxilado de OCBZ (Cl_{MHD}), que se expresaron en medianas y rangos (25-75). También, se analizó la relación dosis-concentración para ambos fármacos en terapia combinada. Se comparó el Cl_{MHD} en monoterapia con OCBZ: 1.19 l/kg.día, 0.99-1.54, n= 49, con inductores: 1.10 l/kg.día, 1.09-2.80, n= 29, y con LMT: 1.33 l/kg.día, 1.20-1.61, n=24, sin cambios significativos. La relación dosis-concentración para la OCBZ es lineal para los tres grupos (r=0.78, 0.70 y 0.65, p< 0.01). El Cl_{LMT} con inductores 2.27 l/kg.día 1.80-3.85, n=61, fue mayor significativamente que con OCBZ, 1.00 l/kg.día, 0.76-1.39, n= 24 (p<0.01, test de Dunn). La relación dosis-concentración de LMT siempre fue lineal (r=0.74 y 0.66, p<0.01), pero con diferentes pendientes: inductores, m=0.027 vs. OCBZ, m=0.008, p<0.001. La asociación LMT y OCBZ, muestra un manejo farmacocinético más seguro que con inductores enzimáticos.

424. Vena umbilical humana: evidencia funcional de la presencia de una subpoblación de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1B}. María Pía Rogines-Velo, P.Tamara Brodsky, Facundo G. Pelorosso, Camila L. Zold, Rodolfo P. Rothlin.

³ Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. (e-mail: farmaco3@fmed.uba.ar)

Evidencias previas obtenidas en nuestro laboratorio sugieren la presencia de una población heterogénea de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} y 5-HT_{1B/1D} en vena umbilical humana (VUH). El objetivo de este trabajo fue caracterizar que subtipos de receptores 5-HT₁ median una respuesta contráctil en este tejido. Se obtuvieron cordones umbilicales de embarazos normales. Se disecaron anillos de VUH y se montaron bajo tensión isométrica en solución de Krebs a 37°C, pH 7,4 y burbujeada con carbógeno. Luego de un período de estable-

zación de 2,5 h, se obtuvieron curvas concentración respuesta (CCR) al agonista selectivo 5-HT_{1B/D}, L-694247 obteniéndose una pCE₅₀ de 8,77±0,73 (n=45). Sin embargo, la distribución de pCE₅₀ en condiciones control demostró ser sumamente heterogénea. La administración previa (10 min) a las CCRs al L-694247, de una concentración sub-umbral de KCl (8-12 mM) produjo una potenciación y una menor dispersión de sus valores de pCE₅₀ (pCE₅₀ 9,46±0,34, n=36). En estas condiciones, SB-216641, antagonista selectivo 5-HT_{1B}, produjo un corrimiento competitivo hacia la derecha de la curva a L-694247 (pA₂=9,17). Los valores de afinidad descriptos en la literatura para el agonista 5-HT_{1B/D} L-694247 (pK_i=10,5) y para el antagonista SB216641 (pA₂=9,1), y los resultados respectivos obtenidos en este trabajo son consistentes con la presencia de receptores 5-HT_{1B} en VUH.

INMUNOLOGIA VI

- 425. El modelo de inmunización génica en la obtención de anticuerpos contra proacrosina humana.** Carolina Veaute, Laura Furlong, Juan Biancotti, Mónica Vazquez-Levin.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. CONICET-UBA. Buenos Aires. (mhvaz@dna.uba.ar)

Proacrosina humana (h-proacrosina) es una proteína espermática que participa en la fertilización. Se analizó la respuesta humoral luego de la inmunización con el ADNc de h-proacrosina, y se comparó con la obtenida usando un producto truncado de h-proacrosina. Se preparó un vector de expresión eucariota con el ADNc de h-proacrosina, el péptido señal de alfa 1 antitripsina, y el promotor del CMV (pSF2-Acro). Proacrosina recombinante (Rec-40) y un fragmento N-terminal (Rec-30) se obtuvieron de la expresión de h-proacrosina en bacteria, y se aislaron por SDS-PAGE preparativa. Se inocularon ratones hembra BalB/c (7 semanas) con pSF2-Acro (10, 20 ó 40 ug de ADN intramuscular) o con 20 ug de Rec-30 (subcutánea/ intraperitoneal) cada 3 semanas, 4 veces. Como control se usó vehículo o plásmido sin inserto, (pSF2). La respuesta se evaluó por ELISA desde la semana 6 utilizando Rec-40 como antígeno. Los animales respondieron a la inmunización con Rec-30 y con pSF2-Acro en forma similar. La respuesta máxima se obtuvo en la semana 10. Veinte ug de ADN purificado con columnas de intercambio iónico fueron suficientes para producir una respuesta específica. El título cubió a un 50% del máximo 6 meses después de iniciado el protocolo. La inmunización génica con el ADNc de h-proacrosina resultó eficaz en la obtención de anticuerpos específicos, sin requerir la purificación previa de la proteína.

- 426. Genotipificación del Sistema Rh en líquido amniótico.** Carlos Cotorruelo, Claudia Biondi, Silvia García Borrás, René Di Mónaco, Walter Martino, Amelia Racca.

Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. (ccotorr@agatha.unr.edu.ar)

La evaluación del estado fetal en embarazadas aloinmunizadas se realiza a través de amniocentesis seriadas, exponiendo a los fetos RhD- a riesgos innecesarios. El locus *RH* está compuesto por los genes *RHCE* y *RHD* en individuos RhD+ y solo por el gen *RHCE* en individuos RhD-. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del gen *RHD* en células fetales obtenidas de líquido amniótico (LA) por PCR. Se estudiaron 65 muestras de LA: 48 de madres RhD+ y 17 de madres RhD- (11 sensibilizadas con anti-D). Se confirmó el origen fetal del ADN comparando el patrón genético obtenido por PCR de un locus VNTR y 3 loci STR en las muestras de ADN de LA y sangre materna. En las muestras no contaminadas (n=62) se realizó la genotipificación *RHD* utilizando una estrategia de PCR multiplex que permite la obtención de 3 productos de amplificación en los fenotipos RhD+ (1238 pb

del intrón 4 del gen *RHCE*, 587 pb del intrón 4 del gen *RHD* y 250 pb de la región 3' del gen *RHD*) y sólo un fragmento de ADN (1238 pb) en los fenotipos RhD-. Se genotipificaron 54 fetos RhD+ (8 de madres RhD- sensibilizadas) y 8 fetos RhD- (3 de madres RhD- sensibilizadas). La genotipificación del ADN fetal permite diagnosticar con una única amniocentesis fetos en riesgo real de Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal y evitar la utilización de métodos invasivos en los casos de fetos RhD-.

- 427. Inmunomodulación inducida por el embrión humano vía JAK/STAT en la etapa preimplantación.** U Markert, C Scheider, F Stori, H Özörnek, U Koldovsky.

Instituto de Obstetricia y Ginecología Friederich Schiller. Universität Jena, Alemania.

La regulación de la función de los linfocitos en la decidua y la placenta es esencial para el éxito de la implantación y la invasión. El objetivo del presente trabajo fue comparar los efectos inmunoregulatorios de sobrenadantes de embriones humanos preimplantativos (SEP) con los efectos de sobrenadantes de coriocarcinomas humanos. Para ello linfocitos de donantes alogeneicos fueron estimulados con PHA durante 36 horas para el posterior análisis de la expresión de superficie de las subunidades a, b y g de IL-2R, CD69, CD71 y CD95 y para el análisis de la expresión de Jak1, Jak3, Stat3 y Stat5. Para el análisis de la producción intracelular de IL-2, g-IFN e IL-10 las células fueron estimuladas durante 5 horas con PMA/ionomicina. SEP de un total de 40 cultivos de embriones fueron añadidos en un volumen de 50%. **Resultados:** El análisis de los resultados obtenidos con linfocitos estimulados con PHA y con el añadido de SEP muestran una expresión significativa mayor de IL-2Ra, CD69 y CD71 y menor de IL-2Rb e IL-2Rg y CD95. La expresión de INF-g y de IL-2 fue reducida en un 45% de linfocitos (muestras) y elevada en un 15%. La expresión de Jak y Stat fue menor o constante; sólo la expresión de Jak3 fue incrementada cuando los linfocitos fueron incubados con SEP. **Conclusión:** En contraste con lo observado previamente con sobrenadantes de coriocarcinomas, SEP aumenta la expresión de señales de activación y de Jak3 en linfocitos pero suprimen la expresión de las subunidades IL-2Rb y -g, lo que podría indicar mecanismos distintos para escaparse del sistema inmune materno local

- 428. Producción de citoquinas in vitro por linfocitos de sangre periférica y de cordón umbilical.** Cecilia R. Greco, María F. Cuello, Adriana B. Vivas y Mirta A. Koncurat.

Departamentos de Inmunología, Patología y Anatomía Animal. Universidad Nacional de Río Cuarto. (cgreco@exa.unrc.edu.ar)

En el presente trabajo estudiamos la acción *in vitro* de Medio Condicionado de Placenta Humana (MCPH) en linfocitos periféricos en mujeres en el momento del parto y en sangre de cordón umbilical. Cultivamos sin y con 10% de MCPH linfocitos periféricos de mujeres en parto y de sangre de cordón. Determinamos por IFI los porcentajes de células CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ y CD56⁺ y cuantificamos por ELISA GM-CSF, TGFB₂ e IL-13 en los sobrenadantes de dichos cultivos. En los **sobrenadantes de linfocitos de sangre periférica** de mujeres en parto estimulados con MCPH se dosaron las 3 citoquinas con un gran aumento del GM-CSF (1000pg/ml) acompañado de una disminución significativa de linfocitos CD8⁺ (p<0,05) y CD56⁺. Este aumento del GM-CSF estaría demostrando su síntesis dado su papel en la inflamación durante el parto. En **sobrenadantes de linfocitos de sangre de cordón** cultivados sin y con MCPH, encontramos valores similares GM-CSF atribuibles a su rol como factor crecimiento. Por el contrario el TGFB₂ alcanzó valores de 700pg/ml en cultivos con MCPH, junto con disminuciones no significativas de las células CD4⁺ y CD56⁺. El aumento de TGFB₂ estaría contrarestando la acción pro-inflamatoria del GM-CSF y modulando respuestas

citotóxicas. Tal efecto no se debería a la IL-13, ya que no la detectamos en estos sobrenadantes.

429. GM-CSF, IL-13 y TGF- B_2 en placentas porcinas y humanas. Mirta A. Koncurat, Cecilia R. Greco, Ramiro A. Martínez, y Adriana B. Vivas.

Departamentos de Patología Animal, Anatomía Animal y de Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto. (mkoncurat@ayv.unrc.edu.ar)

La placenta funciona como un órgano inmuoendócrino regulando la gestación. El objetivo de este trabajo fue investigar algunas citoquinas en extractos placentarios humanos y porcinos, especies con placentación diferente. Se dosaron por ELISA mediante kits comerciales humanos: GM-CSF, IL-13 y TGF B_2 en medios condicionados de placenta humana a término (MCPH, n=5); homogenatos porcinos (HoPP n=20) de 30, 50, 70, 90 días y a término y medios condicionados de placenta porcina (MCPH n=20) en los mismos períodos gestacionales. Con respecto al **GM-CSF** en MCPH dosamos 700 pg/ml. En porcinos lo encontramos solo en MCPH (30 días) y HoPP (60 días), coincidentes con el período de desarrollo del sistema inmunológico porcino fetal. La **IL-13** se encuentra al principio (MCPH: 30 días) y al final de la gestación (MCPH: 90 días, HoPP: 90 días y HoPP a término) en extractos placentarios porcinos, no encontrándose en humanos. El **TGF- B_2** lo hallamos en extractos placentarios porcinos a lo largo de la gestación (30, 50, 70 y 90 días) y también en sueros de sangre periférica de cerdas preñadas en dichos períodos gestacionales. MCPH=456pg/ml. Conclusión: encontramos valores similares de TGF- B_2 en los extractos placentarios humanos y porcinos, a pesar del diferente tipo de placentación, ellos indicarían el papel inmunosupresor de esta citoquina durante la preñez.

430. Cambios en los niveles sanguíneos de vitaminas A y e, selenio, leucocitos y expresión de receptores de adherencia para migración en neutrófilos en vacas lecheras alrededor del parto. Guillermo Meglia, Anders Johannisson, Lars Petersson, y Karin Persson Waller.

Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. Gmeglia@hotmail.com Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

La susceptibilidad a enfermedades infecciosas, tal como mastitis, en vacas lecheras es muy alta durante el periodo alrededor del parto. Los mecanismos de defensa del animal están disminuidos desde aproximadamente tres semanas antes del parto hasta tres semanas después del mismo. Las causas no son claras, sin embargo, ocurren una serie de cambios metabólicos y hormonales durante este periodo, los cuales pueden influir negativamente sobre el sistema inmune. En este ensayo se tomaron muestras de sangre de diez vacas lecheras (raza Roja y Blanca Sueca) un mes antes del parto, al parto y un mes después del mismo. Las concentraciones séricas de vitaminas A y E, y los niveles de selenio (Se) en sangre fueron analizadas, como así también el número y diferenciación leucocitaria, y la presencia de los receptores de adherencia para migración CD62L y CD18 en neutrófilos. Los niveles de vitaminas A y E disminuyeron significativamente al parto, mientras que los de Se aumentaron. Al parto leucocitosis fue detectada, explicada por neutrofilia, y linfopenia. Las proporciones de neutrófilos positivos a CD62L disminuyeron significativamente al parto. Los cambios observados en los niveles sanguíneos de vitaminas y Se al parto fueron principalmente en respuesta a la formación de calostro, a cambios en la ingesta de materia seca y al metabolismo ruminal. Los bajos niveles de vitaminas A y E al parto pueden tener efectos negativos en el funcionamiento del sistema inmune. Las menores proporciones de neutrófilos positivos a CD62L al parto resultarían en menor migración hacia los tejidos, contribuyen-

do a un aumento en la susceptibilidad a enfermedades, como mastitis.

431. Diferente producción de IgG asimétrica por linfocitos B aislados de placenta y de sangre de cordón umbilical en presencia de citoquinas. Andrea Canellada, Angela Färber, Teresa Gentile, José Dokmejian, Anja Keil, Ana Zenclussen, Silvia Miranda, Udo R Markert, Ricardo A. Margni.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Universidad de Buenos Aires. Departamento de Obstetricia e Inmunología Clínica, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Alemania. Email: ramargni@ffyb.uba.ar

Se analizó la capacidad de producción de moléculas IgG asimétricas por linfocitos B aislados de placenta y de sangre de cordón umbilical, estimulados con IL-6 y otras interleuquinas. Para la separación de los linfocitos B placentarios (LP) el tejido decidual de la placenta fue disgregado mecánicamente, tratado con colagenasa y tripsina, sometido a un gradiente de Ficoll, y los linfocitos B fueron obtenidos utilizando anti-CD19 „micro-beads“ y MACS (magnet activated cell separation). Los cultivos fueron estimulados con IgG de ratón anti-CD40-humano y co-incubados con I k fibroblastos transfectados con Fc γ -murino. Para analizar la influencia de diferentes citoquinas, se añadieron dosis óptimas de IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 o mezclas de ellas a los cultivos. Los linfocitos B de cordón (CU) fueron aislados por gradiente de Ficoll y procesados como los de placenta. Las diferentes citoquinas indujeron los siguientes porcentajes de IgG asimétrica: 1. IL-6 (LP: 42.5%, CU: 31.6%); 2. IL-10 (LP: 27.5%, CU: 13.8%); 3. IL-10 + IL-11 (LP: 31.5%, CU: 12.3%); 4. IL-10 + IL-6 (LP: 34.6%, CU: 11.5%); 5. IL-10 + IL-6 + IL-4 (LP: 32.8%, CU: 18.7%). Conclusiones: Los resultados preliminares indicarían que linfocitos B provenientes de placenta cultivados en presencia de diferentes combinaciones de citoquinas sintetizan IgG asimétrica en mayor proporción a la observada cuando se analizó la IgG producida por células de sangre de cordón en cultivo. Student's t test, p: 0,0015.

432. Hiperactividad inmunológica asociada a hiporespuesta glucocorticoidea en ratones knock-out para B-endorfina frente a un challenge inmunológico. Damián Refojo¹, Damián Kovalovsky¹, Michael Hayward², Marcelo Rubinstein³, Malcolm Low², Johannes Reul⁴, Florian Holsboer⁴, Eduardo Arzt¹.

Lab. Fisiología y Biología Molecular UBA¹; Vollum Inst. Portland²; Ingebi³, Max Planck Inst. Munich⁴. e-mail: earzt@bg.fcen.uba.ar

En estudios iniciales y en concordancia con trabajos recientes, hemos demostrado que la ausencia de B-endorfina facilita la proliferación de esplenocitos activados por mitógenos. Siguiendo esta línea de investigación estudiamos la liberación de Factor de Necrosis Tumoral (TNF) inducida por endotoxina (LPS-5 ug/ml) por macrófagos esplénicos en cultivo de ratones knock-out (KO) para la secuencia codificante de B-endorfina comparativamente con animales normales congénicos (Wild Type-WT). La liberación de TNF fue significativamente mayor en animales KO (27.6 ± 11.3 ng/ml) que en los WT (1.0 ± 0.4) (p < 0.05). Este efecto se asocia a una mayor susceptibilidad a la muerte inducida por endotoxemia experimental. Además estudiamos la respuesta del eje adrenal al LPS (250 ug/ml, i.p). El pico de corticosterona en los animales KO (media ± SEM, ng/ml): 35 ± 13.3 fue menor que en los WT: 642 ± 122 (p<0.01). Similares experimentos se desarrollaron en ratones KO condicionales hipofísicos específicos (pHal KO). Nuevamente los animales pHal KO mostraron una menor respuesta de corticosterona al LPS (625 ± 38 ng/ml) que los pHal WT (1056 ± 122 ng/ml) (p<0.01). Los ratones KO tienen una mayor actividad mitogénica linfocitaria, un aumento en la libe-

ración de citoquinas proinflamatorias y una respuesta del eje adrenal disminuida, lo cual facilitarían la respuesta inmunológica. En resumen, la B-endorfina cumpliría globalmente un papel inhibitorio en el desencadenamiento de la respuesta inmune.

433. Aumento de la producción de anticuerpos por acetato de medroxiprogesterona (MPA). Mónica Vermeulen, Claudia Lanari, Alfredo Molinolo, Romina Gamberale, Jorge Geffner y Mirta Giordano.

Depto de Inmunología, Academia Nacional de Medicina y Lab. de Carcinogénesis Hormonal, IBYME. Buenos Aires. e-mail: mirtagiordano@imaginaria.com.ar

El acetato de medroxiprogesterona (MPA) es ampliamente utilizado en el tratamiento de adenocarcinomas de mama y endometrio y en el síndrome de anorexia-caquexia. Previamente encontramos que el MPA incrementa los niveles de Acs contra antígenos T-dependientes por su acción directa sobre los leucocitos. Para estudiar el mecanismo ejercido por el MPA sobre la respuesta humoral, células de ganglio de ratones inmunizados con 200 μ g de ovalbumina (OVA) s.c. se cultivaron *in vitro* con MPA 10^{-10} M. Dos días después se cuantificó el número de células plasmáticas por la técnica de ELISPOT, observando que el MPA no modificó la proporción de células productoras de Igs anti-OVA (Ct:86 \pm 5; MPA:100 \pm 6, LPS:140 \pm 8, X \pm ES, n=7, p<0.01 Ct vs LPS). Asimismo, se encontró que el MPA induce incremento de IgM (Ct:0.46 \pm 0.17; MPA:1.0 \pm 0.15) e IgG1 (Ct:0.46 \pm 0.02; MPA:1.04 \pm 0.06) (X \pm ES, p<0.01 Ct vs MPA, n=5) sin afectar la producción de IgG2a. Finalmente, se determinó que el efecto inmunoadumentador del MPA involucra su acción a través de los receptores para progesterona (PRG) ya que la respuesta humoral contra OVA se inhibió en presencia de: RU486 y onapristona (ZK) (Ct: 0,20 \pm 0,03, MPA:0,67 \pm 0,10; MPA+RU486:0,21 \pm 0,05; MPA+ZK:0,20 \pm 0,05, DO a 492nm X \pm ES, p<0.01, n=5). Estos resultados demuestran que el MPA, interactuando con receptores para PRG, aumenta selectivamente la producción específica de anticuerpos sin ejercer un efecto policlonal sobre las células B.

434. Efecto del losartán, un antagonista selectivo de los receptores AT1 para angiotensina II, en un modelo de síndrome de distres respiratorio agudo (SDRA) desarrollado en ratas Wistar. Silvina Raiden, Yanina Pereira, Victor Nahmod, Valeria Sosa, Mirta Giordano y Jorge Geffner.

Departamento de Sustancias Vasoactivas. Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari. Departamento de Inmunología, IHEMA, Academia Nacional de Medicina. e-mail: geffner@mail.retina.ar

Mostramos previamente que el losartán: a) inhibe la interacción del fMLP con sus receptores y b) mejora el perfil ácido-base en ratas desafiadas con *Pseudomonas aeruginosa*. Aquí, analizamos otros aspectos relativos a la acción del losartán. Las ratas Wistar anestesiadas fueron instiladas i.t. con Bordetella bronchiséptica (*Bb*) (10^9 UFC/ml). El losartán (20 μ g/kg/min) fue administrado por infusión endovenosa continua, inmediatamente luego del desafío, salvo en el grupo experimental 3. **Grupo experimental 1:** exámen de sobrevida. El losartán prolongó la sobrevida de los animales infectados, observándose a las 12 hs del desafío una sobrevida del 20% en el grupo control y del 80% en el grupo tratado (n=10, p < 0.01). **Grupo experimental 2:** A las 4-6 hs del desafío, se realizó el recuento de bacterias a partir de homogenatos de pulmón. El grupo losartán mostró un menor recuento bacteriano: 5.1 \pm 0.9 UFC. 10^7 /ml vs 1.74 \pm 0.8. UFC. 10^7 /ml (control vs losartán, n= 5, p < 0.01). **Grupo experimental 3:** la administración del losartán fue iniciada a las 2-4 hs del desafío, momentos en los cuales los valores de saturación de O₂ se encontraron comprendidos en el rango 80-90%. Analizamos los niveles de saturación de O₂ a las 3-4 hs posteriores, encontrando 48 \pm 8% vs 84 \pm 6%, grupo control vs losartán, n=6, p < 0.01). Nuestros resultados sugieren que el losartán podría constituir

una herramienta terapéutica útil en el tratamiento del SDRA de origen bacteriano.

435. Modulación de la expresión de PECAM-1/CD31 en células tumorales. Romina Carnevale, Viviana Lutzky, María del Carmen Salamone, Leonardo Fainboim, Eduardo Chuluyan.

Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. (chulu@interar.com.ar)

PECAM-1/CD31 es una molécula de adhesión expresada en endotelio, plaquetas, monocitos, neutrófilos y una subpoblación de linfocitos T. En trabajos previos observamos una baja expresión de CD31 en una línea celular de melanoma (IIB-LES) y de adenocarcinoma de colon (HCT116). El objetivo del presente trabajo fue modular la expresión de CD31 en células tumorales. Bajo distintas condiciones de cultivo, se analizó la expresión de CD31 en membrana (CD31m) y citoplasma (CD31c) con ensayos de inmunofluorescencia por citometría de flujo. A diferencia de las células endoteliales, la expresión de CD31m en células tumorales subconfluentes fue mayor (46 \pm 2%) a la observada en las confluentes. El tratamiento de las células tumorales con ionomicina, 8BrAMPc y 8BrGMPc, no modificó la expresión de CD31m; sin embargo, PMA (10ng/ml, 48 hs) redujo la expresión a niveles indetectables. Los niveles de CD31c fueron un orden de magnitud mayores a los de CD31m. Marcaciones de membrana y citoplasma realizadas a 4°C y 37°C revelaron la internalización de CD31 en células tumorales, pero no así en endotelio. Citocalasina B (5 μ g/ml, 1h) aumentó (90 \pm 18%) la expresión de CD31m en IIB-LES. Estos resultados demuestran un mecanismo de exocitosis/endocitosis de CD31 en células tumorales dependiente de citoesqueleto. (Financiado por UBACYT-JM31, CONICETPIP0905)

436. Expresión de moléculas de adhesión y del CMH en células de tumor; su relación con la progresión y regresión tumoral. Ana C Donadio, Silvia Frede, María M Remedi, Fabiana L Serna, Miguel A Vides.

Bioquímica Clínica. Ciencias Químicas.UNC.(e-mail mremedi@bioclin.fcq.unc.edu.ar)

En un modelo experimental de tumor se estudió la relación entre la progresión/regresión tumoral, el desarrollo de una respuesta inmune específica y la expresión, en la célula tumoral, de moléculas CMH clase I y II (IA e IE) e ICAM-1. En animales con tumores progresivos, solo 1 de 6 casos estudiados mostró una respuesta inmune celular específica (ensayo de proliferación *in vitro*). El estudio en biopsias de estos tumores -mediante inmunohistoquímica- reveló moderada cantidad de células IE+ y la expresión de ICAM-1 en células tumorales en migración y cercanas a vasos. El infiltrado celular fue predominantemente polimorfonuclear (PMN). En animales con tumores regresivos, un mayor porcentaje de casos presentaron respuesta inmune celular positiva (6 de 9). Biopsias de estos tumores revelaron infiltrados mononucleares, una expresión de IE disminuida y de ICAM-1 sólo en células tumorales aisladas. La expresión de IA fue escasa a nula mientras que CMH clase I fue positiva en todos los casos. La expresión de ICAM-1 jugaría un rol importante en el reclutamiento y activación de PMNs. La coexpresión de antígenos CMH clase II junto a ICAM-1 en células que potencialmente llegan a órganos linfáticos secundarios podrían modular la respuesta inmune celular a una respuesta Th1, la que participaría del control tumoral.

437. Participación de productos de óxido nítrico sintasa (NOS) y ciclooxigenasa (COX) en el proceso tumoral. Ágata D'Agostino, Lilia Lauría, Lilia Davel, Alejandro Español, M. Adela Jasnís, Eugenia S. de Lustig, María Sales.

Instituto de Oncología A.H. Roffo y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires, Argentina (inmuroff@fmed.uba.ar)

Ha sido descrito que el óxido nítrico (NO) promueve el crecimiento tumoral a través de la producción de prostaglandina E_2 (PGE_2), probablemente por aumento de la permeabilidad vascular. Previamente demostramos por Western blot que la línea LMM3 derivada de un adenocarcinoma mamario murino expresa las isoformas II y III de NOS ($0,140$ y $0,058$ OD/ mm^2). Estudiamos el «cross-talk» entre las enzimas productoras de ambos mediadores (NOS-COX) en LMM3 y su participación en la migración tumoral, según la técnica en herida. La producción basal de PGE_2 ($137,1 \pm 12,5$ pg/ 10^5 cel) determinada por RIA es inhibida en un 85% por indometacina (10^{-6} M; $n=4$), inhibidor no selectivo de COX y en un 52% por NS-398 (10^{-4} M; $n=3$), inhibidor selectivo de COX II, lo que implica la participación de la isoforma inducible de dicha enzima. Dichos inhibidores disminuyen la migración de las células tumorales en 40,3% y 25% ($p<0,001$ y $p<0,05$) respectivamente en relación al valor basal (54025 ± 1102 um^2). La aminoguanidina (AG) (2×10^{-3} M; $n=3$), inhibidor de NOS II, potencia en un 108% la producción de PGE_2 . La producción basal de NO ($2,70 \pm 0,35$ uM de NO_2^-) se inhibió en un 93% ($n=3$) con AG y en un 70% ($n=3$) con NS-398. El L-NAME y la AG inhiben la migración en un 35% y en un 40,6% ($p<0,001$) respectivamente. Concluimos que en la línea LMM3 el NO producido endógenamente por la isoforma inducible de NOS inhibe la síntesis de PGE_2 por COX y es el mediador indispensable del proceso de migración tumoral.

438. Estudio de la capacidad inmuoestimulante de oligo-deoxinucleótidos (CpG-ODN) durante el envejecimiento. Belkys A. Maletto, Andrea S. Rópolo, María C. Pistoressi-Palencia.

Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. E-mail: cpistore@bioclin.fcq.unc.edu.ar.

Cuando ratones BALB/c jóvenes (3m) y envejecidos (18m) fueron inmunizados en el día 0 y 15 con OVA (60ug/animal/dosis) más CpG-ODN (1826) (50ug/animal/dosis) observamos que en los animales de 18m se induce el mismo nivel de anticuerpos (IgGtotal) post primera y post segunda inmunización que en animales de 3m. El título (\log_{10}) de los isotipos de anticuerpos tipo IgG1 fue en 18m: $5,3 \pm 0,2$; en 3m: $5,8 \pm 0,2$ ($p:0,009$) y para IgG2a, en 18m: $4,7 \pm 0,4$ y en 3m: $5,0 \pm 0,2$. El índice mitótico de células mononucleares (CM) de ganglio linfático estimuladas con OVA fue 6,3 en 3m y 6,1 en 18m. En estos sobrenadantes de cultivo observamos que en ratones de 18m la inmunización induce INFg ($2,165$ pg/ml) y no se detecta IL-5. Al analizar la respuesta de CM de bazo de ratones de 3 y 18m no inmunes estimuladas *in vitro* con CpG-ODN (3uM), encontramos índices de proliferación (18m:63 y 3m:66) y de liberación de IL-12 (18m: $1,550$ pg/ml y 3m: $1,500$ pg/ml) similares en ambos grupos. También encontramos una expresión similar de B7-2 en células CD19+ (citometría de flujo). Nuestros resultados muestran que CpG-ODN es capaz de inducir en ratones envejecidos una respuesta inmune específica de tipo Th1 similar a la inducida en animales jóvenes (CONICET, CONICOR, SeCyt ROEMMERS).

439. Capacidad de distintos adyuvantes para movilizar poblaciones celulares en animales envejecidos. Andrea S. Rópolo, Belkys A. Maletto, Mónica Clocker y María C. Pistoressi-Palencia

Bioquímica Clínica. Facultad Ciencias Químicas. UNC. E-mail cpistore@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Debido a que en ratones envejecidos (18m) OVA/CpG-ODN induce una respuesta inmune a OVA similar a la de animales jóvenes (3m), analizamos cómo este adyuvante afecta la movilización de poblaciones celulares en órganos linfáticos, en forma comparativa con CFA y *Bordetella pertussis* (Bp). Para ello inmunizamos con OVA y distintos adyuvantes. En los órganos linfáticos, se estudiaron las poblaciones celulares por citometría de flujo. Se observó que OVA-CFA induce un au-

mento de células GR-1+, CD11b+ en bazo y aparición de focos de hemocitopoyesis y OVA/CpG-ODN un aumento de linfocitos B en bazo y ganglio en ambas edades y focos de hemocitopoyesis en bazo de 18m. Para visualizar el antígeno usamos OVA marcada con FITC. Con OVA-CFA el porcentaje de células OVA-FITC+ en ganglio drenante es menor en los animales de 18m ($p<0,001$) y esas células son GR-1+, CD11b+. Al utilizar Bp el porcentaje de células OVA-FITC+ también está disminuido en los animales envejecidos ($p<0,01$), y estas células son CD19+ y CD11b+. Con OVA/CpG-ODN no hubo diferencias en los porcentajes de células OVA-FITC+ con la edad, siendo estas células CD19+ y CD11b+. Los resultados muestran que CpG-ODN afecta a las poblaciones celulares de 18m en forma similar que a las de 3m. (CONICET, CONICOR, ROEMMERS, SeCyt)

440. Estudios histológicos y fenotípicos de tejidos linfáticos periféricos en un modelo experimental de envejecimiento. Diego O. Alignani, Miriam Liscovsky, Silvia Frede, María C. Pistoressi-Palencia.

Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. E-mail cpistore@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Para interpretar la inmunobiología del envejecimiento se estudiaron distintos tejidos asociados a la respuesta inmune en ratones normales. Por microscopía óptica común y alta resolución la piel de ratones envejecidos (18m) mostró alteraciones histológicas con predominio de figuras apoptóticas en epidermis y menor cantidad de células de Langerhans (ATPasa+) (816 ± 113 vs $1.624 \pm 34/mm^2$ en jóvenes(3m)). En lámina propia de intestino no se observaron diferencias en el número de las células IgA+ (inmunohistoquímica), en tanto que el número de linfocitos intraepiteliales fue mayor en 18m ($p<0,05$). En ganglios linfáticos se observó mayor cantidad de centros germinales y los senos subcapsulares fueron más amplios, ocupados por macrófagos y linfocitos grandes. La citometría de flujo en ganglios de 18m mostró similares porcentajes de linfocitos CD3+ (79%) y CD19+(21%) que los de 3m (82% y 18%) pero el número total de células fue menor. En bazo de 18m se encontró 58% de CD3+, 28% CD19+ y 14% de Mac1+, y en los de 3m 45%, 45% y 10% respectivamente. La proliferación de células mononucleares de 18m frente a ConA estuvo disminuida con respecto a los de 3m ($p<0,05$) y no varió frente a LPS. En 18m las interleukinas mostraron un perfil desviado hacia Th2 (18m: INFg: 71 ng/ml, IL5: 4.813 pg/ml, en 3m INFg: 40 ng/ml IL5: 47 pg/ml). (CONICET, CONICOR, SeCyt)

441. La hormona de crecimiento recombinante humana (rhHC) incrementa la producción de IL-6 y óxido nítrico (NO) en cultivos de células MG-63. Sara Feldman, Carlos Guillem Viejo, Oscar Bottasso, Pedro Esbrit.

Instituto de Inmunología, Fac.Cs. Médicas-UNR. Fundación Jiménez-Díaz, Madrid, España. E-mail: sfeldman@arnet.com.ar

Dado los efectos osteoanabólicos que ejercería rhHC, y la acción anti-apoptótica de la IL-6 sobre células osteoblásticas nos propusimos estudiar si la estimulación con rhHC en células MG-63 (derivada de osteosarcoma humano) podía inducir la producción de IL-6. Las células se cultivaron en medio DMEM (1 g/l de glucosa) suplementado con 10% suero fetal bovino, hasta confluencia y luego fueron depletadas de suero durante 48 horas antes de la adición de medio con o sin rhHC (133 ng/ml). El nivel de expresión de mRNA para IL-6 humana se estudió mediante RT-PCR con una banda amplificada de 416 pares de bases, revelando un incremento 2.5 mayores en células cultivadas en presencia de rhHC. Para profundizar en torno al estado de activación conferido por rhHC también se estudió la liberación de NO al medio de cultivo. El tratamiento con rhGH, mostró una respuesta dosis dependiente, lográndose un plateau a su mayor concentración (133 ng/ml).

Nitritos (media \pm ds, de 3 experimentos independientes con dicha dosis, nmoles/millón de células): 1.62 ± 0.2 , no estimulado 0.95 ± 0.1 , $p < 0.025$. La acción moduladora de la rHHC sobre la actividad ósea podría estar relacionada a su efecto facilitador sobre la producción de IL-6, que de alguna manera involucraría además la síntesis de otro mediador con conocidas influencias regulatorias sobre el hueso como el NO.

442. Estudio de distintos factores que participan en la fagocitosis de glóbulos rojos. Claudia Biondi, Alejandra Ensínck, Carlos Cotoruelo, Silvia García Borrás, Amelia Racca.

Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. (aracca@fbioyf.unr.edu.ar)

La remoción selectiva de glóbulos rojos senescentes (GRSe) es un proceso complejo en el que participan diferentes parámetros. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de distintos factores sobre la interacción entre GR y monocitos: rigidización por calor, modificaciones de pH, desialinización y tiempo de conservación. Se estudiaron 25 muestras de sangre periférica de donadores normales. En alícuotas de cada muestra se realizaron distintos tratamientos: 1) rigidización a 47°C, 2) modificación del pH (a: 5.34, b: 6.30, c: 7.33, d: 9.20), 3) desialinización por enzimas (a: neuraminidasa y b: tripsina), 4) conservación con ACD (días: a: 7, b: 14, c: 21, d: 28, e: 35, f: 42) 5) separación por centrifugación diferencial de GR jóvenes (J) y GRSe. Se realizó el ensayo de eritrofagocitosis enfrentando monocitos isólogos con las suspensiones eritrocitarias anteriores. Los % de Células Fagocíticas Activas obtenidos fueron: 1) 3.2 ± 0.7 , 2a) 11.1 ± 1.0 , 2b) 15.5 ± 0.9 , 2c) 3.2 ± 0.9 , 2d) 4.1 ± 1.0 , 3a) 10.7 ± 1.6 ; 3b) 3.7 ± 1.2 ; 4a) 2.7 ± 1.3 , 4b) 4.4 ± 1.6 , 4c) 6.7 ± 1.2 , 4d) 9.6 ± 1.0 , 4e) 11.7 ± 0.8 , 4f) 13.0 ± 1.2 , 5) GRJ: 2.9 ± 0.9 , GRSe: 17.3 ± 2.2 . Los resultados obtenidos en este modelo *in vitro* indican un aumento significativo ($p < 0.05$) de la fagocitosis a pH ácido, desialinización mayor al 80% y conservación superior a 28 días. Estos factores favorecerían la destrucción eritrocitaria vía fagocitosis, mecanismo involucrado en la homeostasis tisular.

443. Inhibición de la capacidad esterásica del componente C1 del complemento (C) por bilirrubina no conjugada (BNC). Sandra Arriaga, Aldo Mottino, Adriana Almará.

Departamento de Bioquímica Clínica e Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

Previamente se demostró que BNC inhibe la actividad hemolítica del componente C1 del C, efecto atribuido en parte a su interacción con C1q. En este trabajo se analizó la acción del pigmento sobre la actividad enzimática de C1 humano purificado, evaluando su capacidad para hidrolizar el éster etílico de N-acetil tirosina, en presencia y ausencia de BNC. El pigmento, adicionado durante o después del proceso de autoactivación de C1 (15 minutos, 37°C), produjo un 100% de inhibición de la actividad esterásica en concentraciones iguales o superiores a 4 mg/dl. Para evaluar la unión de BNC a los distintos subcomponentes de C1: C1q, C1r y C1s, las fracciones obtenidas por electroforesis en SDS-PAGE del C1 purificado se incubaron con 14 C-BNC. Los resultados indicaron «binding» del pigmento marcado a las bandas correspondientes a C1q, C1r y C1s, en similar magnitud. El análisis del espectro de absorción de BNC en presencia de C1q de origen comercial, mostró un corrimiento análogo al observado luego de la incubación de BNC con albúmina, sugiriendo una naturaleza similar para ambas interacciones. Se concluye que la inhibición de la actividad hemolítica de C1 por BNC se ejercería tanto a nivel de C1q como de la C1 esterasa, resultando ambos efectos de una interacción directa pigmento-subcomponente.

444. Mecanismos celulares y moleculares involucrados en la inhibición de la respuesta alogénica por Galectina-1. Rosanna Ramhorst¹, Adriana Corigliano¹, Cecilia Daroqui², Natalia Rubinstein¹, Elisa Bal de Kier², Leonardo Fainboim¹ & Gabriel Rabinovich¹.

¹Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires y ²Instituto de Oncología "Angel Roffo". Buenos Aires.

Galectina-1 (Gal-1), una proteína capaz de descifrar glicocódigos específicos, reveló propiedades inmunoregulatorias *in vitro* e *in vivo*. En el presente estudio investigamos los mecanismos moleculares involucrados en dichas propiedades y la expresión de esta proteína, utilizando como modelo el cultivo alogénico. Células mononucleares fueron sometidas a un cultivo mixto linfocitario durante 5 días en presencia de Gal-1 (2, 4 y 40 μ g/ml). Se observó una inhibición dosis-dependiente de la respuesta alogénica ($p=0.0032$), que fue revertida utilizando el disacárido específico TDG. Esta supresión se verificó a través de un incremento en los niveles de apoptosis (anexina-V) de células T CD45RO+. La incorporación al cultivo de IL-2 (10 U/ml) entre 24 y 48 h fue capaz de inhibir el fenómeno supresor. A los fines de evaluar si la supresión ejercida por Gal-1 era dependiente de TGF-B, sobrenadantes de dichos cultivos alogénicos fueron sometidos a un ensayo biológico para dicha citoquina. No se observó un incremento estadísticamente significativo en los niveles de TGF-B luego de la incubación con Gal-1. Sin embargo, a través de ensayos de Western blot, se observó una reducción de los niveles de la proteína Bcl-2 en presencia de Gal-1 exógena, proporcional al tiempo de cultivo transcurrido. Finalmente, se estudió la cinética de expresión de Gal-1, revelando su pico de expresión máxima a las 48-72 h de inicio del cultivo alogénico. Concluimos que Gal-1 podría participar en procesos de regulación negativa de la respuesta inmune, contribuyendo a la homeostasis por mecanismos independientes de TGF-B y dependientes de Bcl-2.

445. Inducción de la expresión de MICA en linfocitos T activados. Luciana L. Molinero, Natalia Rubinstein, Mercedes Fuertes, Leonardo Fainboim, Gabriel Rabinovich, y Norberto W. Zwimer.

Lab. de Inmunogenética, Htal. de Clínicas «José de San Martín», Buenos Aires. e-mail: nzwirner@infovia.com.ar.

MICA es una molécula polimórfica del complejo HLA, expresada en células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, monocitos y epitelio intestinal, pero no en linfocitos T y B. MICA se expresa además en células tumorales e induce la síntesis de aloanticuerpos en pacientes transplantados. Su ligando es la molécula NKG2D, un receptor activador de citotoxicidad de células NK. El **objetivo del presente estudio** fue analizar la expresión de MICA en linfocitos T activados y las señales involucradas en dicha estimulación. Por Western blot observamos que MICA se induce en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ cuando son estimulados con linfocitos alogeneicos. Dicha expresión es máxima a los 7 días y sigue una cinética similar a la respuesta proliferativa. La activación de linfocitos de sangre periférica con un AcMo anti-CD3 también induce la expresión de MICA, mientras que el bloqueo del cultivo alogeneico con anticuerpos monoclonales anti-HLA clase I o anti-HLA-DR inhibe dicha inducción. Esto indica que la expresión de MICA en linfocitos T activados sería dependiente de la estimulación a través del complejo TCR/CD3. Estos resultados sugieren que MICA sería un marcador de activación celular que podría ejercer funciones inmunomodulatorias al ser reconocido por células citotóxicas NKG2D*.

446. Inhibición de la expresión de CD11b/CD18 a través de RFc por IgG e IgA en monocitos humanos. Paula

Fernández, Gabriela Salamone, Analía Trevani, Mónica Vermeulen, Romina Gamberale, Jorge Geffner y Mirta Giordano.

Departamento de Inmunología. Academia Nacional de Medicina

La beta2-integrina CD11b/CD18 cumple un papel relevante en la adherencia leucocitaria, siendo además receptor para C3bi y fibrinógeno. Previamente habíamos reportado que la exposición de monocitos humanos a superficies recubiertas por IgG (ilgG) inhibe la expresión de CD11b/CD18. Para investigar el papel de los distintos RfCgamma se preincubaron los monocitos con Acs específicos (fragmentos Fab) y se cultivaron 24 hs sobre ilgG. Finalmente, se midió la expresión de CD11b por citometría de flujo. Encontramos que el bloqueo del RfCII, pero no de RfCI o RfCIII, impide la inhibición de CD11b inducida por ilgG: MIF: Ct=5067±890, ilgG=2840±610, anti-RfCII= 4989±715, anti-RfCII+ilgG=4775±670, n=5, p<0.05. Asimismo, el pretratamiento con Acs anti-CD18 inhibe, no sólo la adherencia al sustrato sino también la disminución en la expresión de CD11b. El efecto inhibitorio de la ilgG parece ser específico para monocitos, ya que no se observó en otras células mieloides como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Teniendo en cuenta que los monocitos presentan además receptores específicos para Fc de IgA (CD89), evaluamos la expresión de CD11b en monocitos cultivados durante 24 hs sobre IgA inmovilizada, encontrando inhibición en los niveles de CD11b expresados: MIF: Ct= 6910±940, ilgA= 1910±480, n=7, p<0,01. Quedan por determinar las consecuencias funcionales de la menor expresión de CD11b/CD18 inducida a través de RfC para IgG e IgA .

447. Expresión, renaturalización in vitro, purificación y cristalización de un TCR recombinante. Mauricio C De Marzi, Marisa M Fernández, Andrea S Llera y Emilio L Malchiodi.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET-UBA), FFyB, UBA, emalchio@ffybu.uba.ar

Los receptores de linfocitos T (TCR) recombinantes han sido muy dificultosos de aislar y purificar. Los primeros intentos exitosos de expresión se realizaron en células de mamíferos pero con dificultades en la obtención de cantidades suficientes para su caracterización estructural y funcional. El objetivo de este trabajo fue producir la cadena VB 5.2 de un TCR humano en un sistema procarionte de alto rendimiento, para destinarla a estudios estructurales de cristalografía de Rayos X. Se construyeron dos cadenas beta: una hVB5.2hCB humana y otra quimérica con un dominio C de ratón, hVB5.2mCB1. Se realizó un clonado en pET 26b para expresión en cuerpos de inclusión. Se obtuvo 36mg/L de proteína desnaturalizada, replegándose in vitro por el sistema de dilución. El mejor rendimiento se obtuvo con la quimera, que se purificó por exclusión molecular e intercambio aniónico rindiendo 2mg/L de proteína purificada. El estudio de condiciones de cristalización permitió obtener cristales en SO₄Li, PEG 4000, Tris-Cl pH 8-8.5. Para la criopreservación en N₂ líquido se agregó glicerol 18%. Los cristales de 0.3x0.3x0.1µm, difractaron a 5.5Å. El análisis de las imágenes recogidas para el procesamiento de datos, indicó que estaríamos en presencia de un cristal machado. Se exploran mejoras en las condiciones de cristalización y criopreservación para lograr un mejor set de datos de difracción.

INFECTOLOGIA II

448. Vaginitis y vaginosis en una población ambulatoria. Adriana Belmonte, Mónica Noguerras, Adriana Ombrella, Diana Dlugovitzky.

Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. e-mail: schenquer@yahoo.com

Como consecuencia de la alteración del ecosistema vaginal (por el sobrecrecimiento de la flora endógena o tras la adquisición de microorganismos patógenos) se producen cuadros de vaginitis específicas y/ o vaginosis bacteriana (VB). Se evaluó la prevalencia y asociaciones de estas patologías en una población ambulatoria. Se estudiaron microbiológicamente los hisopados vaginales de 241 mujeres sexualmente activas (MSA), con edades comprendidas entre 13-52 años, no gestantes ni menopáusicas. Para el diagnóstico de VB se siguieron los criterios de Amsel, el score de Nugent y los cultivos en medios selectivos. La presencia de levaduras y parásitos se detectó por observación microscópica en fresco (400x) y cultivo en medios específicos. Evaluando los resultados, se observó que en 175 pacientes se recuperaron agentes productores de las distintas patologías, siendo la preponderante VB en un 64,4% (n:113), seguida por candidiasis (C) en un 28,5% (n:50) y trichomoniasis (T) en solo el 8,6% (n:15). Se encontró asociación de VB y C en un 10,8% (n:19) y con T en un 4% (n:7); en una sola oportunidad se encontró triple asociación VB, C y T (0,57%). Ante el hallazgo de asociaciones microbianas, podemos aseverar que la recuperación de un agente no descarta la presencia de otros, de allí la necesidad de realizar estudios de todos los patógenos en las secreciones vaginales de MSA.

449. Estudio comparativo de reinfecciones en la Enfermedad de Chagas Experimental. Juan Bustamante, Walter Rivarola, Ruth Fernández, Julio Enders, Ricardo Fretes, José Palma, Patricia Paglini.

Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

El objetivo del presente trabajo fue comparar el efecto de las reinfecciones en el estadio agudo y crónico de la enfermedad de Chagas. Las reinfecciones se efectuaron con 50 parásitos/animal en el día 10 y 20 de la infección aguda (G I, n=40) y de los días 360 y 370 del estadio crónico (G II, n=40). Cada grupo tuvo su control sin reinfectar, y en todos los casos se valoró parasitemia, sobrevida, electrocardiografía e histopatología. La parasitemia se controló semanalmente hasta los 90 días en el G I y 240 días en el G II. Se obtuvo un valor de 172.060,60 ± 13.961,98 y 246.500 ± 4.292,18 parásitos/ml posterior a las dos reinfecciones en el G I, y 6.800 y 0 parásitos/ml post-reinfecciones en el G II. En el G II la sobrevida fue similar al grupo sin reinfectar, mientras que en el estadio agudo, la sobrevida de los reinfectedos fue del 50% con respecto al 70% del grupo sin reinfectar (p<0,05). En cuanto a los cambios electrocardiográficos se observaron severas alteraciones en el 100% de los animales del G I y G II, con respecto a su propio control (p<0,01). La histopatología mostró severas lesiones en el G I y en el G II diferenciándose ambos de los grupos sin reinfectar. En el análisis comparativo de ambos modelos de reinfección se observa que la misma compromete los mecanismos del huésped para el control de la misma, pero la reinfección en el estadio agudo afecta la sobrevida lo que no sucede cuando la reinfección se produce en la etapa crónica.

450. Efecto de la indometacina en la infección herpética ocular en el ratón Balb/c. Cecilia Courrèges y Fabián Benencia.

Patología Experimental, Facultad de Medicina y Lab. Inmunoquímica, Departamento Química Biológica, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. (e-mail: cecu@hotmail.com)

El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de la indometacina, antiinflamatorio no esteroideo, sobre la progresión de la infección herpética ocular. Para ello, ratones Balb/c de 5 semanas de edad fueron divididos en 4 grupos experimentales, infectados luego de escarificar la superficie corneal,

con 10^5 UFP de herpes simplex tipo 1, cepa F. La indometacina (0, 2, 10 y 30 $\mu\text{g/ml}$) fue administrada a los distintos grupos de animales en el agua de bebida a partir del momento de infección y durante todo el experimento. Los resultados obtenidos muestran que a la máxima concentración de indometacina empleada, los signos de la enfermedad aparecen más tempranamente y alcanzan mayor severidad en el grupo tratado respecto del control. Se observa un aumento de la mortalidad en el grupo tratado respecto del control (día 5 postinfección (pi.), tratado 50% vs. control 10%). En los animales tratados, el título viral (UFP/ml) de lavados oculares aumenta (tratados; día 1 pi, 1880 ± 230 vs. control 420 ± 124 , $p < 0.05$). El ADN extraído de ojos y de trigémino fue amplificado para detectar genoma viral por PCR. Los resultados obtenidos indican que todos los ojos resultaron positivos a partir del día 1 pi. tanto en el grupo tratado como en el control. Sin embargo, en el caso del trigémino, al día 7 pi., se observó que el 100% de las muestras del grupo tratado eran positivas para el virus mientras que en el grupo control sólo se registró un 30%. Los datos obtenidos indican que la indometacina favorece la replicación del virus en el ojo y su posterior diseminación.

451. Evaluación electrocardiográfica y estructural en la infección con dos cepas de *Trypanosoma cruzi*. Walter Rivarola, Juan Bustamante, Ruth Fernández, Julio Enders, Ricardo Fretes, Patricia Paglini.

Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

El presente trabajo analiza las modificaciones electrocardiográficas conjuntamente con cambios estructurales en ratones infectados con 2 cepas de *T. cruzi* (Tulahuen y cepa aislada de un paciente crónico que pertenece al zimodema 12). Se estudió además la sobrevida, la parasitemia y la afinidad y densidad de los receptores β -cardíacos. Se utilizaron 2 grupos de ratones Albinos Suizos, uno infectado con 50 tripomastigotes de cepa Tulahuen/animal (GT, $n=50$), y el otro inoculado con 50 parásitos cepa Z12 Argentina/animal (GT, $n=50$). Los estudios se realizaron en la etapa aguda, indeterminada y crónica de la infección. El GT presentó un valor de parasitemia mayor al GZ ($p < 0.01$) siendo mayor la sobrevida en este último grupo. Las alteraciones electrocardiográficas se caracterizaron por bloqueos aurículo-ventriculares e intraventriculares en ambos grupos, pero la diferencia fundamental se observó en la frecuencia de presentación de estas alteraciones. El GT las presentó en un 35%, 50% y 90% de los animales en el período agudo, indeterminado y crónico respectivamente, en el GZ un 14%, 40% y 40% respectivamente. La histopatología mostró una severidad mayor en el GT que en el GZ, al igual que la densidad y afinidad de los receptores. El presente trabajo muestra que la infección con la cepa Z 12 es menos agresiva que la cepa Tulahuen, lo que determinaría menores alteraciones y mayor sobrevida del huésped.

452. Sobreinfección *in vitro* con dos cepas distintas de HIV-1 y formación de pseudotipos. Pablo Fernández Larrosa, Ana Ceballos, Silvia Marquina, Liliana Martínez Peralta, Roberto Rabinovich.

Centro Nacional de Referencia de SIDA. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina. UBA. e-mail: nifer@arnet.com.ar Presentado por la Dra. Duvilanski

Actualmente se observa a nivel mundial la aparición de un porcentaje elevado de recombinantes de HIV-1. Algunos autores sugieren que la mayor parte de estos recombinantes se produciría por sobreinfección. Para estudiar si la sobreinfección con una cepa viral distinta puede llevar a la formación de pseudotipos, células de la línea H9-HTLVIII B persistentemente infectadas con la cepa HXB2 fueron sobreinfectadas con la cepa MN(m.o.i.=1). Se ensayó la neutralización de la progenie viral obtenida del sobrenadante de las células sobreinfectadas con un anticuerpo monoclonal que sólo neutraliza HXB2, utili-

zando como sistema revelador células MT2 para detectar producción de sincicios. En las MT2 con producción de sincicios se estudió el ADN proviral mediante PCR de la región del C2V3 del gen env, seguida de la digestión con la enzima *BsmA I* (con distinto patrón de corte para ambas cepas). Además se trató la progenie viral producida por las MT2 con el anticuerpo citado. Los resultados mostraron que el anticuerpo anti-HXB2 no neutralizó la progenie viral de las células sobreinfectadas, correspondiente a los sobrenadantes del día 2 al 7 post-sobreinfección, ya que se observó producción de sincicios en células MT2. En estas células MT2, el genoma proviral se caracterizó como HXB2. A diferencia del virus producido por las células sobreinfectadas, el virus producido por las células MT2 era neutralizado por el anticuerpo. La sobreinfección con una cepa viral distinta podría permitir la formación de pseudotipos o mezcla fenotípica y favorecer la dispersión de la variante primoinfectante aún en presencia de anticuerpos neutralizantes contra ella.

453. Efecto inhibitorio del ácido láurico sobre la maduración y producción del virus Junín. Susana Bartolotta, Cybele García, Nélida Candurra, Elsa Damonte.

Laboratorio de Virología, Departamento de Qca. Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Ciudad Universitaria, Pabellón II, 4º piso, CP 1428 EHA, Buenos Aires. e-mail: edamonte@qb.fcen.uba.ar

Los ácidos grasos son componentes preponderantes de la bicapa lipídica de membrana ya que forman parte de fosfolípidos, glicolípidos y triglicéridos. A fin de estudiar la funcionalidad de la membrana plasmática celular en la infección con arenavirus, se evaluó el efecto inhibitorio de ácidos grasos saturados de diferente longitud de cadena hidrocarbonada (C10-C18) sobre el virus Junín (JUNV), mediante un ensayo de inhibición del rendimiento en células Vero. El ácido láurico (C12) fue el compuesto más activo con una CI_{50} de 24,8 $\mu\text{g/ml}$. Este compuesto no tuvo un efecto virucida sobre el virión ni tampoco interactuó con la célula para inducir un estado refractario a la infección. Por el contrario, actuó bloqueando una etapa tardía del ciclo de multiplicación, sin afectar la síntesis de proteínas virales pero reduciendo la expresión de las glicoproteínas de envoltura en la membrana plasmática. Asimismo, se demostró una relación directa entre la inhibición en la producción de JUNV y la estimulación de triglicéridos celulares, siendo ambos efectos inducidos por el ácido láurico y dependientes de la presencia continuada del mismo. Por lo tanto, la reducción en la inserción de glicoproteínas virales en la membrana celular, aparentemente ocasionada por el incremento en el contenido de triglicéridos, parece ser la principal causa responsable de la inhibición en la maduración y producción de partículas virales.

454. Análisis de determinantes de virulencia de una población de *Streptococcus agalactiae*.²Inés Toresani; ^{1,2}Adriana Limansky; ^{1,2}Silvina Francois; ²Guillermo Ebner; ¹Alejandro Viale y ²Emma Sutich. ^{1,2}Isabel Bogado; ²Marchiaro, Patricia; ²Marzi, Marta.

¹Instituto Biología Molecular y Celular, CONICET ²Depto de Microbiología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR; Rosario. Fax:0341-4390465.

Streptococcus agalactiae (EGB) es una importante causa de morbi-mortalidad entre mujeres post-parto y neonatos. Hemos analizado aquí la expresión de antígenos (Ags) proteicos de superficie (X, R y c) y de hialuronidasa (HA) como determinantes de virulencia, así como la capacidad de unión a fibronectina como mecanismo de adherencia. Seleccionamos 50 cepas de EGB; 21 de materiales asociados a procesos no invasivos y 29 a invasivos. Se detectaron Ags polisacáridicos y proteicos y la capacidad de unión a fibronectina mediante aglutinación. La relación clonal de las cepas se estudió aplicando el coeficiente de similaridad y luego, análisis de grupo. La serotipificación distinguió las cepas según: serotipo Ia, 12 cepas; Ib, 4; II, 11; III,

12; IV, 1; V, 6 y NT, 4. El II fue el más frecuente entre las 29 invasivas y el III entre las no-invasivas. El dendrograma muestra las serotipo II invasivas en un subgrupo con elevada relación clonal, así como a las serotipo III no invasivas en otro grupo clonal distante. El Ag R estuvo presente en el 56 % de las II invasivas, y ausente en todas las III. La HA se manifestó en el 76% de las invasivas y en el 44 % de las no invasivas, presentándose en el 85 % de EGB serotipo II. La capacidad de adherencia a fibronectina fue variable. Así, las cepas invasivas II expresaron mayoritariamente el Ag R y la HA, sugiriendo que éstos juegan un rol importante en la patogénesis.

455. Tratamiento con AZT en pacientes infectados con el virus de la Inmunodeficiencia Felina. Nélica Gómez, Beatriz Martiarena, Adriana Fontanals, Adriana Suraniti, Adriana del Prado.

Facultad de C. Veterinarias. UBA. ngomez@fvvet.uba.ar.

El objetivo del presente trabajo es establecer la metodología a seguir con los pacientes afectados por VIF y su tratamiento con AZT. Para ello se estudiaron 36 pacientes felinos infectados con VIF, en las 3 últimas etapas de la enfermedad. El diagnóstico de los Oportunistas se efectuó por los métodos de rutina. Se evaluaron los pacientes por medio de hemogramas, globulinas séricas y citometría de flujo para CD4/CD8. Se trataron con AZT 5 pacientes sin anemia, ni oportunistas y otros 5 gatos con anemias leves. (AZT :5mg/kg c/12h, 5 semanas) Los resultados obtenidos incluyen : anemias (53%), de tipo arregenerativa en su mayoría y linfopenias (67%), cíclicas o persistentes, hiperglobulinemia (96%). Los signos clínicos detectados: linfadenopatías y gingivitis, neumonías, uveitis, piodermias profundas, sarna, afecciones de las vías respiratorias altas e insuficiencias renales. Oportunistas : *Toxoplasma gondii* (38%), *Hemobartonella Felis* (45%), *Micobacterium bovis* (5%), *Cryptococcus neoformans* (12%). Virus de la Leucemia Felina (5%). En los 5 gatos sin anemia, se observó remisión de los signos clínicos y se detectó un aumento de la relación CD4/CD8 en la 4a semana de tratamiento. En los otros 5, la anemia se agravó en la 2º semana de tratamiento y debió suspenderse la medicación, no se detectaron cambios en la relación CD4/CD8.

SISTEMA CARDIOVASCULAR V

456. Disturbios Hemorreológicos en Hipertension Esencial ¹Patricia Foresto, ¹Mabel D'Arrigo, ¹Liliana Di Tullio, ²Roberto Gallo, ²Fernando Filippini, ¹Juana Valverde ³Rodolfo Rasia.

¹Depto. Bioq. Clínica. Fac. Cs. Bioq. y Farm. Universidad Nacional de Rosario. ²Clínica Médica Fac. Cs. Médicas - ³FIR - CONICET - UNR-

El estudio de la agregación eritrocitaria es de interés para cuantificar anomalías en el flujo sanguíneo en vasculopatías como la hipertensión arterial esencial. El objetivo de este trabajo fue evaluar el perfil reológico en pacientes hipertensos, estudiando: agregación eritrocitaria, viscosidad sanguínea (η) y fibrinógeno plasmático (F_p). Se estudiaron 20 pacientes hipertensos y 30 individuos normales. Las medidas de (η) se realizaron en sangre entera (η_{SE}) y plasma (η_p), con un viscosímetro (Brookfield LVDII+). Se calculó la viscosidad relativa (η_R) como el cociente de η_{SE}/η_p . El estudio de la agregación se determinó a través de un parámetro de forma de los agregados (ASP) definido como la relación área proyectada de los agregados respecto del perímetro. Los datos fueron obtenidos con un microscopio invertido conectado a un procesador digital de imágenes. El dosaje de (F_p) se hizo con un coagulómetro CLOT 1A. Los pacientes hipertensos presentaron valores (ASP = 0.69 ± 0.11 y $\eta_R = 4.66 \pm 0.62$) significativamente mayores ($p < 0.00001$) que los individuos normales (ASP = 0.28 ± 0.12 y $\eta_R = 3.28 \pm 0.35$). El F_p (265 ± 70 mg/dl) resultó ligeramente aumentado respecto de los controles (245 ± 40 mg/dl). El presente estudio

demuestra alteraciones reológicas evidenciadas por el incremento en los valores de ASP y de η_R que podrían estar vinculados con el mecanismo responsable de las complicaciones microvasculares en la hipertensión esencial.

457. Perfil hemorreológico (PH) en embarazadas con procesos hipertensivos. Adriana Bollini, Gladis Hernández, Marta Bravo Luna, Luis Cinara, Ivan Tunkiewicz, Marta Rasia.

Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. (abollini@hotmail.com).

Existen estudios del PH en el 3er. trimestre del embarazo habiéndose hallado diferencias asociadas con hipertensión. Objetivo: investigar la relevancia de las propiedades reológicas de la sangre materna en el 2do. trimestre, sobre el probable desarrollo de hipertensión. Se estudiaron 186 pacientes, según criterios de inclusión-exclusión, 23 ± 4 sem. de gestación, embarazo normal, sin retardo de crecimiento fetal ni hipertensión, no fumadoras, sin medicación. Se determinó cc proteínas totales, albúmina, globulinas, fibrinógeno, hemoglobina, agregación eritrocitaria (fotometría), viscosidad sanguínea (VS) y plasmática (viscosímetro cono-plato), hematocrito y deformabilidad eritrocitaria en 2do. trimestre. Presión Arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD, 4to. Ruido), durante el embarazo. Puntos de corte: Diferencia 1ra. consulta/pre-parto: PAS ≥ 25 mmHg, PAD ≥ 15 mmHg. Estadística: ANOVA, regresión múltiple, t de Student (no-apareada). Solamente la VS relativa ($t=1.94$; $p < 0.05$) fue significativamente mayor en embarazadas con PAD ≥ 15 mmHg. Estos resultados sugerirían que la VS debe ser considerada como uno de los factores que determina la eficacia de la perfusión placentaria. Sin embargo, dado que su modificación se refleja sólo débilmente en alteraciones de PAD, su influencia no sería muy importante.

458. Agregación eritrocitaria (AE) y proteínas plasmáticas en ratas obesas. Gladis Hernández, María del Carmen Gayol*, Marta Rasia. Cátedra de Biofísica.

**Cátedra de Biología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. (hgladis@hotmail.com).*

La agregación de los eritrocitos se produce por la presencia de moléculas agregantes en el medio. En el plasma se considera que fibrinógeno y globulinas favorecen el proceso y que albúmina se opone. En trabajos anteriores mostramos diferencias en la reología sanguínea de una línea de ratas con obesidad hipertriglicéridémica peripuberal y diabetes adulta no insulino dependiente (β) respecto de una eumetabólica (α) provenientes de un tronco común. En este trabajo analizamos la incidencia de las proteínas plasmáticas sobre la AE de ratas de ambas líneas de distintas edades: 100, 200 y 300 días. Determinaciones : albúmina (**Alb**), proteínas totales (**PT**), globulinas (**Gl**) y fibrinógeno (**Fb**): colorimétricamente, **AE** fotométricamente, $n=6$ para cada grupo etario de cada línea Estadística: Test t de Student (datos no apareados) y correlación. Nuestros resultados muestran que la AE no varió en forma sistemática con la edad de los animales en ninguna de las líneas; a diferencia de **Fb** y **Alb** que aumentan con la edad y **Gl** que disminuye. Además se observó correlación significativa ($p < 0.05$) de la **AE** con **Alb** (0,415), **PT** (0,506), y **Fb** (0,208). Estos resultados nos conduciría a concluir que las ratas obesas presentan modificación del metabolismo proteico y por ende del proceso de agregación eritrocitaria.

459. El factor natriurético atrial (ANF) en la evaluación del compromiso miocárdico en la enfermedad de Chagas. Susana Cavallero, Jorge Scaglione, Sergio Auger, Adriana Donoso, Ana Puyó, Belisario Fernández.

Cátedras de Biología Celular e Histología y Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Hospital D. Santojanni. Buenos Aires. e-mail: bef@arnet.com.ar

El ANF plasmático se encuentra alterado en diversas patologías con compromiso cardíaco. Nuestros objetivos fueron estudiar la evolución de los niveles de ANF en los diferentes estadios de la enfermedad de Chagas y analizar su utilidad como factor pronóstico del desarrollo de cardiomiopatía (CMP). Se estudiaron 19 pacientes chagásicos (8 en período indeterminado, 5 con trastornos de conducción [TC] y 6 con CMP), 16 controles (C) y 13 pacientes no chagásicos (4 con TC y 9 con CMP). Se determinó el ANF plasmático por RIA (2 muestras/paciente: 1ª=inicial y 2ª=12 meses después). El ANF plasmático fue semejante en los pacientes chagásicos y no chagásicos. Si bien no hubo diferencias significativas en cada grupo entre la 1ª y la 2ª muestra, los niveles del péptido tendieron a ser mayores 12 meses después. El ANF se halló elevado en los pacientes con CMP chagásica y no chagásica con respecto a sus C en la 1ª muestra ($X \pm SEM$, pg/ml) (75 ± 7 vs 26 ± 5 , $p < 0.05$; 195 ± 40 vs 34 ± 4 , $p < 0.01$). En la 2ª muestra se halló aumentado con respecto los C y a los pacientes con TC tanto en los chagásicos (193 ± 55 vs 86 ± 18 , $p < 0.05$ y vs 38 ± 5 , $p < 0.01$) como en los no chagásicos (300 ± 59 vs 82 ± 22 , $p < 0.05$ y vs 32 ± 3 , $p < 0.001$). En conclusión, el ANF no nos permite diferenciar la etiología del compromiso miocárdico pero es un marcador de la evolución de la disfunción cardíaca tanto en pacientes chagásicos como no chagásicos.

460. El preconditionamiento temprano contra el atontamiento postisquémico no involucra a los canales de potasio ATP dependientes. Elena Lascano, Jorge Negroni, Héctor del Valle, Alberto Crottogini.

Departamento de Ciencias Fisiológicas, Farmacológicas y Bioquímicas. Universidad Favaloro. Buenos Aires. (lascano@favaloro.edu.ar)

Se estudió si los canales de potasio ATP dependientes (CKATP) participan en la protección de la primera ventana de preconditionamiento contra el atontamiento luego de una isquemia reversible en ovejas conscientes. El protocolo de isquemia (IR) consistió en 12 min de oclusión de la arteria coronaria descendente anterior y 2 hrs de perfusión. Se estudiaron 3 grupos: 1) basal con glibenclámid (BG): se administró 0.4 mg/kg de glibenclámid (G, inhibidor de los CKATP) 30 min antes de IR; 2) preconditionamiento temprano con G (PTG): el preconditionamiento consistió en 6 períodos de 5 min de isquemia-5 min de perfusión. Este fue seguido de un intervalo de 45 min y luego IR; la G se administró 30 min antes de IR; 3) G antes del preconditionamiento temprano (GPT): se efectuó el mismo protocolo que en 2), excepto que G se administró 30 min antes del preconditionamiento. Durante la perfusión, se evaluó el porcentaje de recuperación de la fracción de espesamiento parietal (microcristales) respecto del valor antes de la 1ra isquemia. Los resultados (media \pm ES, ANOVA, $\dagger p < 0.01$ vs BG) fueron:

	30 min	60 min	90 min	120 min
BG (n=6)	3 \pm 4	21 \pm 10	32 \pm 9	44 \pm 8
PTG(n=6)	24 \pm 4 †	51 \pm 6 †	65 \pm 5 †	76 \pm 6 †
GPT(n=6)	39 \pm 7 †	56 \pm 5 †	68 \pm 5 †	73 \pm 6 †

Los canales KATP no participan como gatilladores ni efectores del preconditionamiento temprano ya que su inhibición con G no impide el efecto protector contra el atontamiento.

461. Los Canales de Potasio Dependientes de ATP no Participan del Precondicionamiento Tardío en Ovejas Conscientes. Jorge Negroni, Elena Lascano, Héctor del Valle, Alberto Crottogini.

Departamento de Ciencias Farmacológicas, Fisiológicas y Bioquímicas. Universidad Favaloro. Buenos Aires. (negroni@favaloro.edu.ar)

Introducción: aunque la participación de los canales de potasio dependientes de ATP (KATPc) está documentada en la protección por preconditionamiento (P) clásico, poco se sabe de su intervención como iniciadores de la cardioprotección en la fase tardía del fenómeno. **Objetivo:** determinar el rol de los KATPc durante el P tardío (PT). **Métodos:** las ovejas se instrumentaron con sensores de presión ventricular, un oclisor coronario y un par de microcristales para medir espesor de pared. Se estudiaron 3 grupos: a) control (C): 12' de isquemia (I) con 2 hs de perfusión (R) [n=6], b) PT: 6 períodos de I-R de 5' c/u 24 hs previas a C [n=8] y c) PT + glibenclámid (PT+Gli): igual a PT con Gli 0.4 mg/Kg 30' antes de los 6 períodos de I-R [n=5]. Se midió en los 3 grupos recuperación de la fracción de espesamiento parietal (FEP). **Resultados:** la recuperación de la FEP como porcentaje respecto del basal (100%) a los 30', 60', 90' y 120' de R (Media \pm SE) muestra:

Grupo	Basal	Isquemia	R 30'	R 60'	R 90'	R 120'
C	100	-30 \pm 16	21 \pm 6	47 \pm 3	69 \pm 5	82 \pm 2.5
PT	100	-12 \pm 6	52 \pm 6 †	77 \pm 5.5 †	85 \pm 5 †	89 \pm 5
PT+Gli	100	-20 \pm 6	50 \pm 6 †	72 \pm 2.5 †	81 \pm 11* 87 \pm 4	

* $p < 0.05$ y † $p < 0.01$ respecto de C (Anova seguido de Scheffé)

Conclusión: los KATPc no participan del inicio de la cardioprotección del PT contra la disfunción contráctil posisquémica en ovejas conscientes.

462. Hiperfibrinogenemias en ratas tratadas con ciprofibrato. Mónica Moya, Vilma Campana, Antonio Gavotto, Juan Simes, Luis Spitalé, José Palma.

Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. e-mail: monicamoya@hotmail.com

Con el objeto de analizar la respuesta farmacológica del ciprofibrato sobre el fibrinógeno y la posible regresión del daño endotelial en aorta de ratas, se expuso a los animales a injurias múltiples (IM) por laparotomías (lotes B y C) en un período de 30 días. Se administró por vía oral 0.05mg/rata/día de ciprofibrato, inmediatamente después de la 3ª cirugía y durante 10 días. La sangre se obtuvo a las 72 hs de la última laparotomía. Fibrinógeno (mg/100ml) se determinó por espectrofotometría y la anatomía patológica se estudió por microscopía óptica. Se observó un incremento estadísticamente significativo de F comparando el lote (B) (336.0 \pm 7.57) con el control (A) (207.0 \pm 3.04) ($p < 0.001$). Similar comportamiento se observó al comparar el lote (B) con el (C) (216.3 \pm 4.6) ($p < 0.001$). El lote de IM + ciprofibrato presentó diferencia significativa al compararlo con IM solamente ($p < 0.001$), por el contrario, al compararlo con el lote control no se observó diferencia significativa. Las lesiones AP fueron semejantes en el lote B y C, y consistían en denudación endotelial y engrosamiento de la íntima de la aorta torácica en el 96% de los cortes estudiados. El ciprofibrato es un hipocolesterolemizante que altera la transcripción del código genético de proteínas a nivel hepático, activando factores de transcripción a nivel del receptor nuclear del PPAR α (peroxisome proliferator activated receptors). Quizás por ser el F una proteína hepática, se disminuiría la síntesis del mismo por un mecanismo similar al producido por el ciprofibrato sobre el colesterol, sin regresión de las lesiones AP.

463. Fosforilación de fosfolamban (PLB) en isquemia y perfusión. Matilde Said, Leticia Vittone, Cecilia Mundiña Weilenmann y Alicia Mattiazzi.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. e-mail: cicme@atlas.med.unlp.edu.ar

La fosfolamban es una fosfoproteína del retículo sarcoplasmático (RS), que regula la actividad de la bomba de Ca $^{2+}$

del mismo y la relajación y contracción miocárdicas. La función del RS está alterada en la injuria por isquemia y reperfusión. Para estudiar si cambios en la fosforilación de PLB participan en esta disfunción se perfundieron corazones de rata (Langendorff) en condiciones: controles (C), 20 minutos de isquemia global (I) y diferentes tiempos de reperfusión (R). La fosforilación de los residuos de PLB: Ser¹⁶ y Thr¹⁷, inmunodetectada por anticuerpos específicos, se expresó como porcentaje de la fosforilación inducida por una dosis máxima de isoproterenol. En I la fosforilación de Ser¹⁶ aumentó significativamente de 3,0±1,0 a 99,8±25,5% (n=9) y la fosforilación del residuo Thr¹⁷ no se modificó. Durante R, la fosforilación de Ser¹⁶ no fue diferente de C, mientras que la de Thr¹⁷ aumentó transitoriamente durante los primeros minutos: 19,1±2,9 (C) vs. 200,0±43,2% (R 1min) (n=12). El tratamiento previo de los animales con reserpina más bloqueo beta anuló el incremento en la fosforilación de Ser¹⁶, sin afectar la fosforilación de Thr¹⁷. La reperfusión con 0 Ca²⁺-EGTA o EIPA 1µM, (inhibidor del intercambiador Na⁺/H⁺, NHE) disminuyó la fosforilación de Thr¹⁷ en R 1min. Conclusiones: 1) Sólo la fosforilación de Ser¹⁶ en I, es dependiente de catecolaminas. 2) La fosforilación de Thr¹⁷ en R, es dependiente del influjo de Ca²⁺, posiblemente por activación del intercambiador Na⁺/Ca²⁺, secundario a la activación del NHE.

464. El péptido auricular natriurético inhibe el cotransportador Na⁺-glucosa en vesículas de membrana luminal de corteza renal de rata. Laura González Bosc, Mónica Majowicz, María del Carmen Ortiz, Florencia Albertoni, Florencia Delgado, Norberto Vidal.

Biología Celular e Histología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. lgbosc@ffyb.uba.ar

Anteriormente observamos que el péptido auricular natriurético (ANP) bloquea competitivamente el cotransportador sodio-glucosa (SGLT1) del intestino delgado de rata. Por ese motivo decidimos estudiar el efecto del ANP sobre la cinética del SGLT2 de la corteza renal de ratas Wistar macho. Para ello utilizamos vesículas de membrana luminal (VML) obtenidas por centrifugación diferencial. Las VML provenían de corteza renal incubada durante 20 minutos en solución de Krebs, a 37°C, en presencia y ausencia de ANP 0.5 µM. Las VML se usaron luego para medir la captación de ¹⁴C-α-metilglucosa durante 20 segundos y determinar los parámetros cinéticos K_{0.5} y V_{máx}. La K_{0.5} para las VML controles fue de 2.53±0.66 (n=11) y para las VML provenientes de cortezas incubadas con ANP fue de 8.28±2.16 (n=6), las constantes difieren significativamente (p<0.006 por test de t). La V_{máx} no se modificó (V_{máx} control: 34.91±2.85; V_{máx} ANP: 43.04±5.09). Estos resultados indican que el ANP también inhibe en forma competitiva al SGLT2. Este efecto sería uno de los mecanismos responsables de sus acciones diurética y natriurética.

GENETICA III

465. Amifostina: Evaluación de la antimutagenicidad y citoprotección en tejidos murinos tratados con idarubicina. Marcelo de Campos Nebel, Irene Larripa, Marcela González Cid.

Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. (e-mail: lacuteci@intramed.net.ar)

Amifostina (WR-2721) es una prodroga aminotiofosforada sintética capaz de proteger a las células normales del efecto tóxico inducido por ciertas drogas antitumorales. Se evaluó el efecto de WR-2721 sobre el daño genético y la apoptosis inducidos por idarubicina (IDA, inhibidora de la topoisomerasa II) en hígado, bazo y sangre periférica mediante la prueba de electroforesis de células simples (SCGE) y el ensayo de la

deoxinucleotidil transferasa terminal (técnica TUNEL). Ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados por vía intravenosa con 250 mg/kg de WR-2721, 6 mg/kg de IDA ó la combinación de ambas (WR-2721 15 min antes que IDA). A las 24 hs se sacrificaron los animales y se evaluó el daño genético (D) medido por SCGE y el porcentaje (promedio) de apoptosis analizado por TUNEL. El D (media±DS) en hígado, bazo y sangre periférica fue de 197,76±57,23; 195,22±42,73 y 39,65±19,60 para los grupos controles, 204,40±17,37; 225,94±72,25 y 56,80±12,45 para WR-2721; 283,78±13,57 (p=0,0265); 276,28±39,50 (p=0,0317) y 200,00±79,30 (p=0,0077) para IDA y 174,83±32,92; 304,43±42,46 (p=0,011) y 202,52±46,70 (p=0,0007) para los grupos tratados con ambas drogas. La apoptosis en hígado y bazo fue de 1,28 y 1,81% para controles; 1,86 y 2,92% para WR-2721; 2,80 y 12,15% para IDA y 1,62 y 17,10% para el tratamiento combinado. Nuestros datos indican que WR-2721 produce efecto antimutagénico y citoprotector en tejido hepático sin alterar la toxicidad inducida por IDA en tejido esplénico y sangre periférica.

466. Estudios genéticos en Hemocromatosis. Una nueva mutación en el gen HFE. Victoria Parera*; Gabriela Atencia*; Manuel Méndez*; María Rossetti*; Adriana De Siervi*; Alberto Muñoz#; Rubén Terg#; Gustavo Romero#, Diana Levi# & Alcira Battle*

**Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA-CONICET #: Hospital de Gastroenterología "Dr. B. Udaondo"- Unidad de Hepatología. e-mail: vicky@qb.fcen.uba.ar*

La Hemocromatosis (HH) es una de las enfermedades metabólicas hereditarias más común entre la población blanca. En la HH se produce el depósito de hierro en distintos órganos, especialmente el hígado y la cirrosis es la manifestación más común en esta enfermedad. Se ha identificado el gen HFE relacionado a la HH y se detectaron 8 mutaciones, entre ellas las C282Y y H63D son las principales responsables de la enfermedad. La mutación C282Y es más frecuente en las poblaciones de origen céltico, en el norte de Europa y en USA. Nuestro objetivo es realizar un estudio genético de pacientes con HH, para determinar la prevalencia de las mutaciones mencionadas en nuestra población, con el objeto de establecer un diagnóstico temprano y evitar las severas consecuencias de esta enfermedad. Se amplificaron y secuenciaron cíclicamente los exones 2 y 4 del gen HFE en 22 pacientes con HH clínica: 5 mujeres (43 a 59 años) y 17 hombres (19 a 76 años). Se detectó sólo un paciente homocigota para la mutación C282Y, otro homocigota para la H63D, un heterocigota para la mutación C282Y y 9 heterocigotas para la H63D. En otro paciente se encontró una nueva mutación puntual (E277K) en heterocigocis: G→A en el nucleótido 797 que cambia Glu por Lys.

467. Protoporfiria Eritropoyética. Cinco nuevas mutaciones en el gen de la Ferroquelatasa. Victoria Parera*#, Gardi Minderman#, Rita Koole#, Ellen de Baar#, María.V. Rossetti*, Alcira Battle* & Félix de Rooij#.

*#: Lab. Internal Medicine II, University Hospital Rotterdam, The Netherlands. *:Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA.CONICET. (vicky@qb.fcen.uba.ar)*

La Protoporfiria Eritropoyética (PPE) es una enfermedad hereditaria producida por fallas en el gen que codifica la ferroquelatasa (FECH). Se caracteriza por una fotosensibilidad temprana, con edema y eritema en áreas expuestas a la luz.. Una minoría de pacientes puede desarrollar complicación hepática importante. Hasta ahora, se han caracterizado 53 mutaciones. Se estudiaron 16 miembros pertenecientes a 6 familias con PPE. Se determinaron las porfirinas totales en sangre, en materia fecal y el índice de porfirinas plasmáticas. Se

aisló el ADN genómico de sangre periférica y se amplificaron los 11 exones de la FECH, se secuenciaron con un Kit de Applied Biosystems y se corrieron en un secuenciador automático: ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). Se identificaron 5 mutaciones nuevas: 2 mutaciones puntuales en el sitio aceptor de splicing, 1 en el intrón 1 (-2exón2) y la otra en el intrón 4 (-2exón 5); una delección en el exón 4 (451delT) y en un paciente con daño hepático grave, en espera para trasplante se detectó una mutación puntual en el exón 3 (C301T) además de una mutación que produce la pérdida de los exones 3 y 4. También se detectaron 2 mutaciones previamente descritas: 400delA y C343T. De los 10 familiares estudiados, 5 fueron portadores de la mutación correspondiente y eran normales bioquímicamente. Este estudio destaca la importancia de realizar los estudios genéticos para identificar los portadores latentes en cada familia.

468. Tipificación de alelos polimórficos de la región 5' del gen de la insulina en relación a diabetes tipo 1.

Valeria Denninghoff, Ariel López, Maximiliano Wilda, Gloria Cerrone, Gustavo Frechtel, Héctor Targovnik.

Cátedra Genética y Biología Molecular. Fac. Farmacia y Bioquímica. UBA. Fax:4964-8296

La diabetes tipo 1 es una enfermedad poligénica. Se estudió el VNTR de la región 5' del gen de la insulina implicado en la etiopatogenia de la misma. Mediante Southern blot se analizó la presencia de polimorfismos en 52 individuos controles y en 52 individuos con diagnóstico clínico de diabetes tipo 1. **Resultados:** se observaron tres clases diferentes de alelos. La frecuencia genotípica de la forma homocigota 1/1 fue de 75% en los diabéticos con respecto al 28,8% en el grupo control; presentando un OR de 7,40. La forma homocigota 3/3 fue más prevalente en los controles (32,7 % vs. 3,8 %). Las frecuencias alélicas observadas en los individuos sanos y diabéticos fueron: alelo 1: 37,5% y 85,5% , alelo 2: 18,3% y 1,9% y alelo 3: 44,2% y 12,5% respectivamente. Se determinaron los RR: 3,71 para los clase 1, 0,17 para los clase 2 y 0,36 para los clase 3. Los alelos de clase 1 fueron subclasificados en clase S y clase L, presentándose sólo alelos L en el grupo control mientras que en los diabéticos el 42,7% presentaba alelos S y el 57.3% alelos L, con una p de 0,0000113. **Conclusiones:** Los resultados de frecuencias genotípicas y alélicas para el alelo 1, en especial el subtipo S, permiten considerarlo un marcador asociado con la diabetes de tipo 1; mientras que los alelos 2 y 3 estarían negativamente asociados con la enfermedad y podrían ser considerados protectores.

469. Identificación de las uniones intron/exón y de los dominios repetitivos y hormonogenéticos del gen de la tiroglobulina humana.

Fernando Mendive, Carina Rivolta, Christian Moya y Héctor Targovnik.

Cátedra de Genética y Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires

La tiroglobulina (TG) es una yodoproteína glicosilada homodimérica que actúa como precursor biosintético de la T₃ y T₄. El gen de la TG humana está ubicado en el cromosoma 8q24.2-8q24.3 a 5.5 cR del marcador AFMA053XF1. El objetivo del presente trabajo fue completar la estructura de dicho gen. Para ello se rastrearon dos bibliotecas genómicas construidas en el fago lambda Charon 4A y Dash II con sondas de las regiones 5', central y 3' terminal del ARNm de la TG entre los nucleótidos 3.002 y 8.410. Se aislaron 27 clones genómicos recombinantes que abarcan al gen desde el intrón 11 hasta el extremo 3'. Se estableció por secuenciación de las uniones intrón-exón que el gen comprende 48 exones cuyos tamaños oscilan entre 66 y 1.101 pb. Los dominios repetitivos de tipo I abarcan los exones 2 al 16 y el exón 22, los exones 20 y 21 contienen los repetitivos de tipo II y el tipo III se extiende entre los exones 23 al 37. Las tirosinas hormonogenéticasceptoras 5, 1291, 2554, 2568 y 2747 se encuentran en los exones 2,

18, 44, 45 y 48 respectivamente. Por otra parte se caracterizaron dos STR complejos TgRi29 (4 alelos) y TgRi30 (8 alelos), en los intrones 29 y 30 respectivamente, útiles para estudios de ligamiento. En síntesis, las 300 Kb del gen de la TG humana comprende 48 exones con dominios funcionales precisos, separados por intrones de tamaño variable.

470. Screening poblacional de portadores de fibrosis quística dentro de la población de Mendoza.

Clara Pott Godoy, Mariana Castellanos, Eduardo Pusiol, María Roqué y Luis Mayorga.

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, IHEM, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo-CONICET, mroque@fmed2.uncu.edu.ar

Introducción: La fibrosis quística (FQ) es causada por mutaciones en el gen CFTR. A nivel mundial se estima una frecuencia de enfermos de 1:200-1:2000 nacidos vivos y una frecuencia de portadores de 1:20-25 individuos. La mutación más frecuente es la delección DF508. Nuestro propósito fue detectar qué porcentaje de portadores para esta mutación había en la población de la ciudad de Mendoza. Métodos: se extrajo ADN de pooled de sangre de 10 individuos por el método de extracción salina. El ADN fue amplificado por PCR con un primer mutagénico que introduce un sitio de corte para la endonucleasa Mbo I sólo en el alelo sano. La presencia de la delección DF508 en un pool se detectó por la aparición de heteroduplex en geles de poliacrilamida. Los pooled positivos fueron cortados con la enzima Mbo I. Resultados: En 100 pooled analizados se detectaron 19 positivos. Un análisis estadístico considerando la posibilidad de más de un portador por pool arroja una estimación de 2,09% de portadores para esta mutación (LC del 95%, 1,34%-3,24%). Conclusiones: dado el 57% para DF508 registrado en Argentina, se puede inferir una frecuencia de portadores de 1:27, y por lo tanto una frecuencia de esta enfermedad de 1: 2500 nacidos vivos, número mucho mayor que la frecuencia registrada en Argentina. Esto indicaría un subdiagnóstico clínico de la enfermedad en nuestro país.

471. Expresión del gen de p16 en tumores hipofisarios humanos.

Machiavelli Gloria*, Cotignola Javier*, Dalamón Viviana*, Surace Ezequiel*, Campero Alvaro**, Bruno Oscar*, Basso Armando**, Burdman José# y Szijan Irene*.

**Cátedra de Genética y Biología Molecular, Fac. Fcia. y Bioqca., UBA. **Cát. Neurocirugía. y #Div. Endocrinología, Hospital de Clínicas. # Serv. Endocrinología, Htal. Israelita y Fundación CIMAE, Buenos Aires, Argentina. gmachi@huemul.ffyb.uba.ar*

Los reguladores del ciclo celular pRB y p16 actúan como supresores de tumor. Ratones defectuosos en una copia del gen RB1 desarrollan tumores hipofisarios. En humanos no se observaron mutaciones en RB1, en estos tumores. Dado que existe una correlación entre pRB y p16, analizamos la expresión del gen de p16 a nivel de RNA en tumores hipofisarios humanos. Se extrajo y purificó el RNA de muestras tumorales, 14 se estudiaron por RT-PCR y 4/14 por Northern blot. Se utilizaron sondas de p16, PRL, GH y Sub alfa de glucoproteínas hipofisarias. Se usaron "Random hexamer primers" y primers específicos de p16 y GAPDH para la RT-PCR. No se observó expresión de p16 por Northern, pero sí de PRL, GH y Sub alfa. Se obtuvieron bandas para p16 en 11/14 productos de RT-PCR, en 3 de las cuales no se había detectado expresión por Northern. Todas fueron positivas para GAPDH por RT-PCR. En 4/11 se observó el fragmento correspondiente a cDNA-p16 completo en forma mayoritaria, en las otras muestras se observaron bandas de menor tamaño. Se demostró que todas ellas corresponden a secuencias del cDNA de p16 por hibridación de los productos de PCR con la sonda. Se concluye que la expresión del gen ocurre en la mayoría de los tumores estudiados. Su ausencia podría correlacionarse con diferentes características del tumor.

472. Recombinación: su influencia en el diagnóstico molecular de portadoras de distrofia muscular de Duchenne-Becker (DMD/BMD) Giliberto Florencia, Ferreiro Verónica, Machiavelli Gloria, Cotignola Javier, Francipane Liliana e Irene Szijan.

Cátedra de Genética y Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Hospital de Clínicas. UBA. fgilibert@huemul.ffyb.uba.ar

La distrofia muscular de Duchenne es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes (1:3500). Recesiva, ligada al X, progresiva y de evolución fatal. El análisis de STR's permite hacer un seguimiento de la segregación de los cromosomas X en una familia y de esta manera determinar indirectamente el estado de portador de los individuos analizados. Un inconveniente del método indirecto radica en la posible recombinación entre el marcador y la mutación. Se realizó este estudio en 66 individuos, observándose 3 eventos de recombinación meiótica (4,5 %). Se analizaron 6 STR's en una familia con antecedentes de la patología, para determinar el estado de portadora de 2 hijas. La conformación de los haplotipos evidenció una recombinación de cromosomas homólogos maternos en el afectado. Las hijas heredaron un cromosoma materno diferente, por lo tanto cada una comparte un fragmento del gen con su hermano afectado. Como la ruptura se encuentra entre el STR 7A (intrón7) y el STR 44 (intrón44) y la delección se localizó en el exón 18 y 19 no es posible determinar junto a qué haplotipo segregó la delección. Se quiere mostrar como la recombinación afecta la informatividad del estudio indirecto y sugerir posibles soluciones a este inconveniente.

473. Predicción de la Eficiencia Terapéutica en Pacientes de Cáncer de Pulmón a ser Tratados con Cisplatino. Daniel López Larraza y Mónica Mayorano.

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular. La Plata (danielop@infovis.com.ar)

La mayoría de los pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas no responden (o responden parcialmente) a la terapia con cisplatino (CDDP), que produce aductos en el ADN. En este trabajo, analizamos si el daño inducido *in vitro* por CDDP en el ADN de leucocitos de pacientes de este tipo de cáncer (21 en total), se correlacionaba con la respuesta a la terapia. Mediante PCR se amplificaron fragmentos de 3 Kb del ADNmt. Los aductos inhiben la amplificación y así pueden ser cuantificados (PCR-stop assay). La D63 (dosis que produce un aducto por fragmento y reduce la amplificación en 63%) fue menor en pacientes con respuesta parcial a la terapia (RP) (n=7; 52±11 ug/ml) que en los que no mostraron cambios (NC) (n=10; 81±20 ug/ml; P=0,0045) y que en los pacientes con progresión de la enfermedad (PE) (n=4; 115±34 ug/ml; P=0,0012). La D63 promedio de los pacientes NC también fue menor que en los PE (P=0,04). Siete de 10 pacientes con D63 <70 ug/ml respondieron a la terapia. Estos resultados indican que el daño producido por el CDDP *in vitro* es mayor en pacientes que responden a la quimioterapia. Además, los datos sugieren que la cuantificación de dicho daño en genes de leucocitos de sangre periférica mediante PCR podría utilizarse para predecir la eficiencia de las terapias de cisplatino en pacientes con esta patología.

NEUROCIENCIAS III

474. Modulación de la descarga de prolactina por allopregnenolona *in vitro*: Participación de los canales de calcio. Griselda Moreno, Claudia Bregonzio, Ricardo Cabrera.

Laboratorio de Investigaciones Neuroquímicas, Comportamentales y Endócrinas. Unidad de Neuroquímica y Farmacología del Comportamiento. Facultad de Cien-

cias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. e-mail: gmoreno@lab.cricyt.edu.ar.

Evidencias previas han mostrado el efecto neuromodulador de progesterona y de su metabolito allopregnenolona (All) en sistemas "*in vitro*". El objetivo del presente trabajo fue evaluar si allopregnenolona es capaz de modificar la descarga de PRL inducida por un estímulo específico como inespecífico "*in vitro*" a nivel hipofisario. Se trabajó con hipófisis aisladas provenientes de ratas hembras ovariectomizadas e impregnadas con estrógeno y progesterona. Los estudios se realizaron en un sistema de perfusión. Los datos se expresan como la media ± SEM de los porcentajes respecto de su basal. Se utilizó test t para el análisis estadístico. All modificó positivamente la descarga de PRL inducida por K⁺ 28 mM (116 ± 40 vs 26.6 ± 19.9; p<0.05). Este efecto fue revertido con diltiazem 2.5 uM, un bloqueante de los canales L de calcio (20.2 ± 19.5 vs. 116 ± 40; p<0.05). NMDA inhibió la secreción basal de PRL (-31 ± 9.6 vs. 5 ± 2 ; p <0.05) y este efecto fue atenuado por All (8.8 ± 4.8; p <0.05). Concluimos: All modularía la liberación de PRL actuando a nivel de los canales de calcio. NMDA participaría a nivel hipofisario de manera no sináptica a través de canales de calcio donde All es capaz de modificar la acción de esta droga. Esta sería una de las primeras evidencias sobre la acción moduladora directa de allopregnenolona a nivel de las lactotropas controlando su secreción.

475. Implicancia del AMPc en la disminución de la liberación neuronal de noradrenalina producida por el Factor Natriurético Atrial. Martín Rodríguez Fermepín, Tamara Wolovich, Liliana Bianciotti, Marcelo Vatta y Belisario Fernández.

Cátedras de Fisiopatología y Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

En trabajos anteriores demostramos que el factor natriurético atrial (ANF) disminuye la liberación neuronal de noradrenalina (NA) tanto basal como estimulada por KCl, en hipotálamo de rata, siendo parcialmente responsables de esta acción los canales de calcio. Con el objeto de definir las vías intracelulares involucradas en dicho proceso, se estudió el efecto de análogos del AMPc y del GMPc sobre la liberación de NA estimulada por KCl 25mM según Vatta y col. (Reg. Pep. 65, 175, 1996). Los resultados indican que el 8Br GMPc 25 y 50 uM no modificó los niveles de NA en ninguno de los tiempos estudiados. Cuando se empleó 8Br AMPc 25 uM no se observó una diferencia estadísticamente significativa, en cambio cuando se utilizó una concentración 50 uM la liberación disminuyó en los primeros 5 y 10 min. volviendo a los niveles basales a los 15 min. (2.27±0.18 vs 3.05±0.21*, 2.18±0.19 vs 3.12±0.26*, 2.78±0.25 vs 2.98±0.12. 8BrAMPc vs control respectivamente, n=6, * p<0.05). El mismo comportamiento se observó con ANF 100nM. (2.00±0.13 vs 3.05±0.21* 1.94±0.09vs 3.12±0.26*, 2.64±0.31 vs 2.98±0.12. ANF vs control respectivamente, n=6, * p<0.05). Si bien la mayoría de los efectos descriptos para el ANF son mediados a través del GMPc, existen evidencias que demuestran una participación tanto de la vía de los fosfoinosítidos como del AMPc en diversas acciones del ANF. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el ANF disminuiría la liberación neuronal de NA activando la vía intracelular del AMPc.

476. Factor natriurético atrial (ANF) y canales de potasio: Efectos sobre la liberación neuronal de noradrenalina (NA). Carina Kadarian, Martín Rodríguez Fermepín, Liliana Bianciotti, Marcelo Vatta, Belisario Fernández.

Cátedras de Fisiología y Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. (mvatta@ffyb.uba.ar)

Trabajos previos demostraron que el ANF disminuyó la liberación neuronal de NA comportándose como un antagonis-

ta parcial de los canales de Ca^{2+} . Otro mecanismo probable y aún no demostrado sería que el factor atrial se comporte como un abridor de canales de K^+ . Para demostrar esta hipótesis se investigaron los posibles efectos de la glibenclamida 10uM (Gli), dendrotoxina 100nM (DTX) e iberotoxina 100nM (IBT) (bloqueantes de los canales de K^+ ATP sensitivos, voltaje sensitivos y activados por Ca^{2+} , respectivamente). Los experimentos de liberación se realizaron en hipotálamo de ratas macho de la cepa Sprague Dawley (250-300g) según Vatta y col (Regul. Pept 65,175,1996). Los resultados se expresan como fracción liberada \pm SEM. *, §, #, †, ‡ $p < 0.05$ vs control, ANF, gli, DTX y IBT, respectivamente (ANOVA y Test de Tukey). Números de experimentos: 6-12. Resultados: - 10 min, Control 0.83 \pm 0.03 vs ANF 0.58 \pm 0.04*, Gli 0.87 \pm 0.8, DTX 1.34 \pm 0.12*, IBT 0.99 \pm 0.07, Gli+ANF 0.72 \pm 0.04§, DTX+ANF 1.03 \pm 0.09* § †, IBT+ANF 1.12 \pm 0.1* §; - 15 min, Control 0.74 \pm 0.03 vs ANF 0.44 \pm 0.03*, Gli 0.81 \pm 0.8, DTX 1.07 \pm 0.10*, IBT 1.54 \pm 0.13, Gli+ANF 0.63 \pm 0.04 § #, DTX+ANF 0.91 \pm 0.05* §, IBT+ANF 1.05 \pm 0.1* § ‡. Los resultados sugieren que el ANF podría ejercer parte de sus efectos reguladores sobre la liberación neuronal de NA a través de los canales de K^+ .

477. Identificación de patrones clínico-eléctricos en el inicio de crisis de pacientes con Esclerosis Hipocampal. Brenda Gigante¹, Silvia Oddo^{1,2}, Mariana Bendersky¹, Daniel Consalvo^{1,2}, Walter Silva^{1,2}, Saidon Patricia¹, Silvia Kochen^{1,2}.

¹Centro Municipal de Epilepsia, División Neurología, Hospital Ramos Mejía, Facultad de Medicina, UBA. Bs. As. ²CONICET. E-mail:skochen@mail.retina.ar

Introducción: El objetivo de este estudio fue identificar patrones específicos clínico-eléctricos en el inicio de las crisis de pacientes con esclerosis hipocampal. **Métodos:** Se analizaron 51 crisis en 19 pacientes registradas con video-EEG. Clasificamos a la actividad eléctrica de acuerdo a la localización y morfología, y analizamos la secuencia de aparición y frecuencia de las manifestaciones clínicas de los primeros 30 segundos del inicio de las crisis. **Resultados:** Los patrones más frecuentes fueron: tipo 1 (temporal unilateral (TU)) 45% y tipo 2 (TU más área frontal contigua) 41%. De acuerdo a la morfología de la actividad eléctrica, los patrones hallados fueron: subtipo a (actividad rítmica (AR) a 5-9 Hz): 49%; subtipo b (AR a 5-9 Hz, seguida de una AR tónica) 31% y subtipo c (actividad tónica de inicio) 20%. La secuencia de las manifestaciones clínicas más frecuente fue: sensación epigástrica \rightarrow inmovilidad \rightarrow automatismos oro-deglutorios \rightarrow unilaterales. **Conclusión:** Identificamos un patrón eléctrico de AR a 5-9 Hz, localizado en la región Temporal en forma unilateral con o sin compromiso de electrodos frontales contiguos, asociado a una secuencia específica de manifestaciones clínicas. En los pacientes candidatos a cirugía de la epilepsia, resulta una valiosa herramienta no invasiva para identificar la Zona Epileptógena.

478. Neuronas histaminérgicas de la amígdala: Modulación de la conducta exploratoria en ratas. Edgardo O. Alvarez, Arturo M. Banzan.

Unidad de Neuroquímica y Farmacología del Comportamiento, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. ealvarez@fmed2.uncu.edu.ar

Hay evidencias que la amígdala baso-lateral está comprometida en la modulación de la expresión afectiva. El objetivo del presente trabajo fue analizar el papel de los receptores histaminérgicos de esta estructura en la conducta exploratoria inducida por ambientes conflictivos novedosos. Se trabajó con ratas macho adultas que se implantaron con cánulas de microinyección en la amígdala baso-lateral. 48 h después diversos grupos se microinyectaron con 1 ul de salina (n=13), 9 nmol (n=14), 45 nmol (n=14) o 90 nmol (n=13) de histamina. 5 min más tarde los grupos se expusieron a un Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico por 5 min. los resultados mostraron

que en el brazo «Sin Pared», las diferentes dosis de histamina inhibieron significativamente el tiempo de exploración (2.6 \pm 1.0 s vs 11.1 \pm 2.8 s, 9 nmol de histamina vs salina, $p < 0.01$) sin cambios en el tiempo de las conductas no exploratorias (emocionalidad). Con 45 nmol de histamina se observó lo mismo en el brazo «Una Pared» (13.9 \pm 3.4 s vs 31.8 \pm 3.2 s, histamina vs salina, $p < 0.01$). En los otros brazos, el tratamiento sólo modificó la emocionalidad (52.2 \pm 18.9 s vs 9.7 \pm 22.4 s, 9 nmol de histamina vs salina, $p < 0.05$, brazo «Pared Alta y Pared Baja»). En conclusión: histamina en la amígdala modula la conducta exploratoria en ambientes conflictivos.

479. Evaluación neuropsicológica pre y post quirúrgica en pacientes con epilepsia. Oddo Silvia, Solís Patricia, Consalvo Damian, Gigante Brenda, Silva Walter, Bendersky Mariana, Saidon Patricia, Kochen Silvia,

1) Centro de Epilepsia, Div. Neurología, Hospital Ramos Mejía. Facultad de Medicina. UBA. 2) CONICET.

Introducción: La evaluación neuropsicológica (EN) es relevante para establecer el estado cognitivo prequirúrgico y el pronóstico post-quirúrgico, contribuye además a la localización y lateralización del foco epileptógeno (FE). Metodología: Se seleccionaron 18 pacientes (P) con epilepsia refractaria, en los que se indicó tratamiento quirúrgico para su epilepsia, con un Cociente Intelectual (CI) $>$ a 70. Se utilizó el protocolo de EN del Centro pre y postquirúrgico. Análisis estadístico: Los datos obtenidos se ajustaron de acuerdo a edad y escolaridad, comparándose con los controles, se consideró patológico (PT) + 2DS. En los casos donde ambas memorias se encontraban alteradas, se aplicó un test de Z. Resultados: Los resultados EN pre-quirúrgicos PT fueron: en 6 p. con FE temporal izquierdo (TI): 66 % memoria verbal (MV), 16% memoria visual (mvi), 66% lenguaje, 16 % atención. En 2 p. con FE temporal derecho (TD): 50% Mvi, 50% MV y 50% atención. El resto de las pruebas no fueron PT. La EN post-cirugía (8 p.), el CI mejoró en todos los pacientes. En los p. en que se realizó lobectomía temporal izquierda, 1 p.(antes MV normal) empeoro y 1 p.(antes MV PT) mejoró. En los p. en los que se realizó lobectomía temporal derecha, 1 p. (antes Mvi normal) empeoro y 3 p.(antes Mvi PT) mejoraron. El resto de las pruebas no fueron PT. Conclusión: Los resultados pre-quirúrgicos nos permitieron confirmar la lateralidad de la zona epileptógena. Luego de la cirugía, todos los pacientes presentaron una mejoría del CI total. Las modificaciones observadas a nivel de la memoria no se asociaron a variables de pronostico específicas.

480. Generación de un modelo de ADHD en raton por lesión neonatal con 6-hidroxidopamina. M. Elena Avale, Tomás Falzone, Diego Gelman, Marcelo Rubinstein.

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular. (CONICET). mrubins@dna.uba.ar Presentados a SAIC por: Graciela Díaz

La enfermedad de Déficit de Atención con Hiperactividad (ADHD) es un desorden neurológico que afecta entre 2 -9 % de la población infantil, y posee tres signos fundamentales: hiperactividad, inatención e impulsividad. El tratamiento utilizado consiste en la administración del psicoestimulante metilfenidato (Ritalina), que paradójicamente en estos pacientes provoca una disminución de la hiperquinesia. Las evidencias sugieren la disfunción del sistema dopaminérgico en esta patología, con un alto componente hereditario. Se han postulado ciertos genes candidatos, como el receptor dopaminérgico D4 y el transportador de dopamina (DAT). Nuestro objetivo fue generar un modelo de ADHD en ratón, que permitirá luego lesionar animales modificados genéticamente y estudiar la participación de los receptores dopaminérgicos en esta enfermedad. Se realizaron inyecciones i.c.v. con diferentes dosis de 6-OHDA en ratones neonatos. Se evaluó la locomoción espontánea y frente a la administración de anfetamina y/o haloperidol. Los ratones lesionados poseen una actividad lo-

comotora 2 a 3 veces mayor que los animales control. Esta hiperlocomoción es revertida por la administración de anfetamina. La respuesta al haloperidol resultó en una curva bifásica, con un descenso inicial de la locomoción, y recuperación posterior. Los resultados indican que hemos obtenido un ratón con características conductuales y respuesta a drogas similares a los pacientes de ADHD.

481. Funcionalidad y modulación del receptor GABA_A por neuroesteroides y barbitúricos: efecto del trauma hipóxico. Diego Rodríguez Gil, Alba Mitridate de Novara, Jorge Massa y Sara Fiszer de Plazas.

Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Fax: (54 11) 4788-5885.

Previamente hemos demostrado que un tratamiento hipóxico de corta duración disminuye el número máximo de sitios de unión de [³H]GABA al complejo receptor GABA_A en el día embrionario (DE) 12. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la modulación por pentobarbital (PB) y alopregnanolona (DHP) de la unión de [³H]GABA en lóbulos ópticos (LO) de embriones de pollo luego de una hipoxia hipóxica aguda. Se realizó también una caracterización funcional del complejo receptor mediante experimentos de captación de ³⁶Cl⁻. Ambos ensayos se hicieron en membranas sinápticas aisladas de LO de animales controles (C) o tratados (H) (hipoxia aguda normobárica, O₂ al 8%, 60 min.). En el DE 12, el tratamiento aumentó significativamente la estimulación máxima producida tanto por el PB (C: 109,7±10,9 %; H: 146,6±10,6 %, P<0,01), como por DHP (C: 61,8±2,7 %; H: 89,9±2,4 %, P<0,01). Sin embargo, ni el flujo máximo de ³⁶Cl⁻ ni la EC₅₀ se vieron alteradas por el trauma hipóxico. Por el contrario se observó un aumento en la modulación por DHP de la captación de ³⁶Cl⁻ inducido por GABA en la preparación proveniente de animales hipóxicos. En conclusión, el LO sometido a hipoxia muestra una disminución del número máximo de sitios de unión de GABA, y una alteración de alguna de sus propiedades moduladoras, sin presentar cambios en la funcionalidad. Esto podría deberse a una reducción en el número de receptores expuestos en la membrana, sin que se afecte el funcionamiento de los receptores remanentes.

482. Edad y dimensiones del cerebro humano. Alfonso M. Albanese, Alicia Merlo, Jorge Miño, Elena Gómez, Adriana Ingratta, Tomás Mascitti, Marcial Cancela, Adolfo Saubidet, Eduardo Albanese.

Facultad de Medicina. Universidad del Salvador. Facultades de Farmacia y Bioquímica y de Medicina.UBA. Hospital Francés. (e-mail: tamara@ssdnet.com.ar)

El cerebro humano sufre modificaciones en función de la edad. El objetivo es el estudio de variaciones de valores de superficies en planos parasagittales de resonancia magnética (RM) del cerebro en función de la edad. En 28 sujetos femeninos diestros (rango de edad 15-74 años) sin patología neurológica ni psiquiátrica se registraron planos parasagittales de RM equidistantes 7 mm del plano sagittal medio. Se midieron por nuestro método (Medicina 57:566-570; 1997) las superficies anterior, media y posterior de los planos parasagittales delimitadas por perpendiculares al segmento que une los puntos anterior y posterior del borde interno del cuerpo calloso y que pasan por dichos puntos. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre la edad y cada una de las superficies derechas e izquierdas. Resultaron significativos (p<0.01) los r entre la edad y los valores de la superficie anterior (derechos: -0.72 e izquierdos: -0.68). Para las superficies media y posterior, si bien presentan correlaciones negativas con la edad, los valores de r son bajos y no significativos. La suma de las superficies anterior, media y posterior tanto derecha como izquierda correlaciona significativamente (p<0.05) con la edad siendo los r respectivos -0.48 y -0.44. Los resul-

tados indican que ambas superficies parasagittales totales disminuyen con el incremento de la edad siendo más afectada la región anterior que corresponde al lóbulo frontal.

483. Una nueva óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt) regulada durante el desarrollo del cerebro de rata. Natalia A. Riobó, Mariana Melani, Leon Krawiec y Juan J. Poderoso.

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires, Bioquímica Nuclear, Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina. nataliariobo@hotmail.com

Hasta el momento se han descrito tres isoformas de óxido nítrico sintasa (NOS I, II, III). Una nueva variante activa localizada en mitocondrias de cerebro de rata (NOSmt) de 144 kDa fue detectada por anticuerpos contra el dominio C-terminal pero no contra el N-terminal de la NOS I ni contra las otras isoformas conocidas de NOS. La NOSmt mostró un Km para L-Arginina de 12.7 μM, seis veces mayor que el de la NOS I (2.0 μM). La actividad fue dependiente de Ca/CaM, NADPH y BH₄ e inhibible por N^G-nitro-L-arginina, coincubación con anticuerpos anti NOS I o tratamiento con proteinasa K. Durante el desarrollo cerebral, la NOSmt y al NOS I siguieron patrones opuestos de expresión y actividad. En la primer semana de vida la expresión de la NOSmt fue claramente superior que la NOS I, mientras que en la segunda semana se observó una relación inversa. A partir de la tercer semana ambas enzimas se mantuvieron estables con actividades de 170 pmol ³H-citrulina min⁻¹ mg⁻¹ para la NOS I y 14 pmol ³H-citrulina min⁻¹mg⁻¹ para la NOSmt. Por ende, la NOSmt sería responsable de la producción de NO en los primeros días de vida mientras que la NOS I prevalecería en el adulto. Las actividades de la MnSOD (mitocondrial) y la CuZnSOD (citoplásmica) siguieron un patrón temporal muy similar al de las NOS correspondientes, evitando así la formación de peroxinitrito. Los resultados sugieren que la NOSmt de cerebro es una variante activa de la NOS I finamente regulada durante el desarrollo.

COMUNICACIONES ORALES

ENDOCRINOLOGIA VI

484. Oxidabilidad de HDL en pacientes diabéticos tipo 2. Silvia Sanguinetti, Fernando Brites, Alicia Elbert, Regina Wikinski, Laura Schreier.

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires leschreier@dbc.ffyb.uba.ar

La oxidación (ox) de lipoproteínas se asocia con aterogenesis pero ox de HDL ha sido poco explorada. El objetivo fue evaluar, en 17 pacientes diabéticos tipo 2 con control aceptable(D) y 17 sujetos sanos pareados(C), la ox de HDL y la relación con su contenido en alfa-tocoferol (a-t), su grado de glicación y actividad de para-oxonasa (PON). Se oxidó HDL aislada con Cu²⁺, se determinó TBARS-HDL, se midió a 234 nm la producción de dienos conjugados y se calculó su velocidad de producción (V), máxima cantidad (Mx) y resistencia a la ox como tiempo lag (lg-t). Se midió a-t y fructosamina (FR) en HDL. Actividad de PON se evaluó con paraoxon con y sin NaCl 1M y fenilacetato como sustratos. Ox-HDL fue mayor en D que en C, media±SD: TBARS 51.7±2 vs 38.1±10.9 nmol malondialdehído/mg.proteína(P),V: 5.1±1 vs 3.1 ±1.1 nmol/mg.P.min y Mx: 232±62 vs 151±53 nmol/mg.P, p< 0.005 respectivamente. Lg-t fue menor en D que en C: 1.5±1.8 vs 6.4±8.2 min, p<0.05. FR y a-t-HDL fue mayor en D: 9.2± 0.5 y 5.7±2 que en C: 7.6± 0.3 y 3.5±1.3 nmol/mg P, p< 0.05 respectivamente. PON no difirió en D y C. Se obtuvo correla-

ción inversa entre a-t y lg-t ($r=-0.52$ $p<0.005$) y directa con TBARS ($r=0.47$ $p<0.05$) y Mx ($r=0.67$ $p<0.005$). No hubo correlación entre FR y ox-HDL. Se comprobó mayor ox-HDL en pacientes diabéticos tipo 2 con control aceptable. La relación directa entre ox-HDL y a-t se explicaría por el modelo de peroxidación mediado por a-t.

485. Alteraciones óseas por diabetes espontánea tipo II en ratas eSS. Stella Daniele, Gustavo Cointry, Margarita Meta, Silvana Montenegro, María Tarrés, Stella Martínez, José Ferretti, Lida Morisoli.

Cátedra de Bioquímica Clínica, Fac.de Cs. Bioquímicas; Cátedra de Biología y Centro de Estudios de Metabolismo Fosfo-Cálcico, Fac.de Medicina, Universidad Nacional de Rosario. (gcointry@arnet.com.ar)

Este estudio analiza los efectos de la osteopatía diabética en 9 ratas adultas eSS (*Fac.de Medicina, UNR*) tomográfica (pQCT) y biomecánicamente (tests de flexión) de sus diáfisis femorales y las de 10 controles no afectadas. Los huesos eSS fueron 43% más rígidos ($p<0.001$) pero 17% menos resistentes ($p<0.007$), es decir, más quebradizos, que los controles. A igual peso corporal, mostraron menor perímetro perióstico y endóstico, área y contenido mineral cortical, y momentos de inercia (indicadores arquitectónicos) para flexión y torsión (-51% y -58%; $p<0.001$); y valores supernormales de densidad mineral volumétrica y de rigidez intrínseca (módulo elástico) del cortical (+3.8% y +154%, $p<0.02$ y $p<0.001$). La mayor rigidez del tejido (y con ella la del hueso entero) es atribuible a la mayor calcificación de la matriz, aunque el modelo no puede describirla cualitativamente, ni descartar otros factores microestructurales. La mayor fragilidad diafisaria (que depende de la rigidez y la distribución del material) sólo podría derivar de un trastorno del desarrollo esquelético que impediría la optimización de su arquitectura, tanto como para que la mayor rigidez tisular no alcance a compensar el defecto. No se conoce si estos resultados, congruentes con los observados en ratas diabéticas por estreptozotocina, son extrapolables a la interpretación de la osteopatía diabética humana.

486. Diagnóstico antropométrico de osteopenia por DEXA previo al diagnóstico biomecánico de osteoporosis. Ricardo Capozza, José Ferretti, Gustavo Cointry, Emilio Roldán, Ricardo Capigioni, Horacio Plotkin, José Zanchetta, Harold Frost.

Instituto/Fundación de Investigaciones Metabólicas y Fac.de Medicina, Univ. del Salvador; Centro de Estudios de Metabolismo Fosfo-Cálcico, Fac.de Medicina, Univ. Nac de Rosario; Southern Colorado Clinic (gcointry@arnet.com.ar)

La masa muscular (MM) es el principal determinante del contenido mineral óseo (CMO) del cuerpo, independientemente de la edad, pero no del sexo y el estado reproductivo. Percentilizamos curvas normales para datos densitométricos (DEXA, $n=1.450$) para CMO crudo o ajustado a masa grasa de niños y niñas, hombres, y mujeres pre- y post-menopáusicas, en función de la MM; y para la evolución etaria (2-87 años) del cociente CMO/MM en ambos sexos. Las 8 curvas CMO vs MM fueron lineales ($p<0.001$). Las 2 curvas CMO/MM vs edad fueron bifásicas, primero ascendentes (crudo) o descendentes (ajustado) hasta la pubertad, sin diferir sexualmente; luego horizontales hasta los 50 años, más alta en mujeres ($p<0.001$), y al final descendentes (crudo) o ascendentes (ajustado), equiparando ambos sexos. Las curvas CMO vs MM permiten analizar datos de CMO según la MM del individuo. Un BMC bajo será adecuado a la musculatura si su percentilo es alto; o inadecuado (osteopenia «verdadera») si es bajo. Las curvas CMO/MM vs edad evalúan esa información obviando dudosos z- o t-scores para el diagnóstico antropométrico de osteopenia. Para calificarla co-mo osteoporosis (que además de

osteopenia implica fragilidad ósea) es necesario analizar parámetros de resistencia ósea (no masa) y de fuerza muscular (no masa) inaccesibles a la DEXA.

487. Relaciones entre masa, densidad y distribución ósea en el radio distal humano. Gustavo Cointry, José Ferretti, Horacio Plotkin, José Zanchetta.

Instituto /Fundación de Investigaciones Metabólicas; Fac.de Medicina, Universidad del Salvador, Bs. As.; Centro de Estudios de Metabolismo Fosfo-Cálcico, Fac. de Medicina, Universidad Nacional de Rosario. (gcointry@arnet.com.ar)

Este estudio correlaciona indicadores tomográficos (pQCT) de masa (área, A, contenido, CMO), densidad mineral volumétrica (vDMO) y de distribución (momentos de inercia, MI) del radio distal en 62 niños y 63 niñas de 6-14 a, 93 hombres (13-84 a), 79 mujeres premenopáusicas (13-50 a) y 31 postmenopáusicas (51-77 a) normales. No hubo diferencias entre niños y niñas. Las relaciones de densidad / masa (vDMO (y) / CMO (x)) mostraron mayor altura para mujeres fértiles que para hombres, pero en las de distribución / masa (MI's (y) / A cortical (x)) plotearon más alto los hombres. Las curvas negativas de distribución / densidad ("d/d", MI's vs vDMO) mostraron mayor MI en los hombres y mayor vDMO en las mujeres hasta la menopausia. Tras la pubertad, los varones periferizaron la cortical (mayor MI), en función de la fortaleza de su musculatura (adaptación a la competencia por alimento y pareja), en tanto las mujeres acumulan hueso endocortical (mecánicamente poco efectivo), porque los estrógenos inhiben su remoción y el crecimiento perióstico. Las curvas "d/d" sugieren que la DMO «areal» densitométrica (DEXA), ciega a la distribución del tejido, subestimaría la calidad ósea en proporción con el grado de osteopenia determinado. Las curvas de pQCT ofrecen referencias para evitar ese falso positivo y aproximar un diagnóstico biomecánico de osteoporosis.

488. Inducción de la actividad de oxido nítrico sintasa en celulas adrenales. Sebastián Lotito, Cora Cymeryng, Cecilia Colonna, Fabiana Comejo, Natalia Grion, Luciana Gadda, Ernesto Podestá.

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155 5º (1121). Buenos Aires. Argentina. Fax 4508-3672 int. 31. cymeryng@fmed.uba.ar

En nuestro laboratorio se ha demostrado que el oxido nítrico (NO) modula negativamente la esteroidogénesis adrenal, presentando evidencias de la participación de un sistema endógeno de generación de NO en dicho tejido. Resultados recientes indican que la estimulación «in vivo» con lipopolisacárido bacteriano (LPS) genera un incremento en la expresión de las isoformas NOS I y II en zona fasciculata de adrenal de rata. Dado que este tejido presenta distintos tipos celulares se decidió estudiar el efecto del LPS en una línea celular de corteza adrenal de ratón (Y1) que produce Δ^4 -3-ceto- C_{21} -esteroides y responde a la estimulación con ACTH. Los resultados mostraron que la incubación de células Y1 con medio condicionado de macrófagos peritoneales (MCMP) estimulados con LPS (2,5 ug/ml) indujo un aumento en la expresión de la isoforma NOS II determinado por northern y western blot. Simultáneamente se observó un incremento en la acumulación de nitritos ($18,00 \pm 0,76$ nmol/mg vs. $80,76 \pm 2,48$ nmol/mg, Control vs. LPS) y una disminución significativa en la producción de esteroides por las células Y1 ($142,17 \pm 4,35$ ng/ml vs. $99,22 \pm 2,25$ ng/ml, Control vs. LPS) luego de 6h de incubación con MCMP. En conclusión, la expresión de la isoforma NOS II puede ser inducida en células esteroidogénicas adrenales siendo el incremento en los niveles de nitritos un índice de su actividad enzimática. La producción de esteroides fue inhibida en forma paralela a la inducción de la enzima.

489. Evaluación de la función adrenal en un modelo de hiperleptinemia por lesión parcial hipotalámica. Mario Perelló, Andrés Giovambattista, Eduardo Spinedi y Andrea Chisari.

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular y Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. (imbice@netverk.com.ar)

Existe una relación entre los sistemas hipotálamo-hipofisario-adrenal y adipocitario, esta interacción es de fundamental importancia en la regulación de la conducta alimentaria. En el presente trabajo evaluamos las funciones adrenal y adipocitaria, basal y post-estrés (inhalaación de vapores de éter por 1'), en un modelo de pseudo-obesidad desarrollado por el tratamiento neonatal con una neurotoxina hipotalámica (glutamato monosódico, MSG) en la rata. Los resultados muestran que, en condiciones basales, los animales lesionados con MSG se caracterizan por hiperleptinemia [$17,65 \pm 3,41$ ng/ml vs. $5,62 \pm 0,98$ ng/ml en el grupo Testigo (T)], hipercorticoesteronemia (B en ug/dl, $7,19 \pm 1,15$ vs. $1,89 \pm 0,32$, respectivamente) y una mayor concentración circulante de CBG ($0,35 \pm 0,01$ vs. $0,19 \pm 0,01$ nmol/ml, respectivamente) ($p < 0,05$). A los 20 min post-estrés: a) los niveles circulantes de B aumentaron más ($p < 0,05$ vs. basal respectivo) en el grupo MSG que en el T ($55,51 \pm 3,63$ y $35,57 \pm 3,21$, respectivamente; $p < 0,05$) y b) la leptina circulante aumentó ($p < 0,05$ vs. basal) a $14,31 \pm 3,8$ ng/ml en el grupo T aunque no se vio modificada en el grupo MSG. Concluimos que la lesión hipotalámica por MSG induce el desarrollo de un estado de leptino-resistencia caracterizado por hiperleptinemia y la falta de un efecto inhibitorio de leptina endógena sobre la liberación de glucocorticoide adrenal. Los elevados niveles de B circulante, parcialmente compensados por un incremento hepático en la síntesis de CBG, podrían estar indicando una falla en los mecanismos de feed-back ejercidos por el glucocorticoide.

490. Respuesta hipotálamo adipocitaria ante una disminución de la actividad adrenérgica central. Andrés Giovambattista, Mario Perelló, Eduardo Spinedi y Andrea Chisari.

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular y Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. (imbice@netverk.com.ar)

CRH, epinefrina (E) y leptina (LEP) intervienen en el circuito controlador del apetito. Con el objetivo de evaluar la influencia de E sobre la actividad adipocitaria, se utilizaron ratas tratadas (i.p., 12 horas antes del experimento) con inhibidores de la síntesis de E: SKF-64139 y SKF-29661 (inhibidores de la feniletanolamina-N-metil transferasa central y periférica y periférica, respectivamente). Se determinaron los niveles basales de CRH hipotalámico y de LEP circulante. El tratamiento con SKF-64139 disminuyó significativamente ($8,52 \pm 1,67$ ng/tej, $p < 0,05$) el contenido de CRH hipotalámico respecto al grupo control ($15,04 \pm 1,23$ ng/tej); contrariamente, SKF-29661 resultó sin efecto ($13,69 \pm 0,89$ ng/tej). Los resultados de LEP circulante indicaron que: 1) SKF-29661 no modificó los niveles de esta hormona ($2,55 \pm 0,3$ ng/ml) comparados con los del grupo control ($2,60 \pm 0,26$ ng/ml) y; 2) SKF-64139 disminuyó significativamente ($1,44 \pm 0,16$ ng/ml, $p < 0,05$) la actividad secretora adipocitaria. Concluimos que la disminución de E central (factor orexigénico) se vería compensada por una menor actividad CRH-érgica hipotalámica e hipoleptinemia (factores anorexigénicos). Estos resultados reafirman el importante rol hipotalámico como regulador de la homeostasis del individuo.

491. Evaluación de la dinámica de cortisol en pacientes con insuficiencia renal crónica. Estela Cardoso, María P. Lozano, Adriana Marcuzzi, Graciela Goldschmidt, Alejandro Arregger, Alfredo Zucchini, Liliana N. Contreras.

Departamentos de Endocrinología y Nefrología. Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari y Hospital Alemán. Fax: 4523-8947

La sintomatología del paciente con insuficiencia renal crónica (IRC) puede enmascarar una disfunción adrenocortical. El cortisol en saliva (SAF) es un método no invasivo que ofrece la oportunidad de investigar la variación circadiana de cortisol y la reserva adrenocortical. Con este objetivo se evaluaron 18 pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis (IRC_h) sin previo tratamiento esteroideo; 15/18 pacientes IRC_h se estudiaron antes de la primera y última diálisis de la semana. El grupo control estuvo integrado por 32 sujetos sanos (C). Se obtuvieron muestras para SAF a las 7.00 y 23.00 hs. El SAF (nmol/l) se determinó por RIA. Los resultados se expresan en mediana y rango. En C el SAF₂₃ fue $2,1$ (0,5-5,2) y SAF₇ $11,2$ (4,0-28,0). En IRC_h: SAF₂₃ ($5,5$; 1,8-15,0) fue significativamente superior a C ($p: 0,0001$). El SAF₇ $9,5$ (1,6-28,0) no fue diferente a C. En 15 IRC_h, el ritmo de SAF evaluado en dos oportunidades no presentó diferencias. En 4 IRC (3 en hemodiálisis) con hipotensión ortostática y en 11C se realizó el test de estimulación con 0,250 mg de ACTH sintética i.m. Definimos en C pico máximo de SAF post ACTH a un valor ≥ 40 nmol/l. Este valor fue alcanzado en 3 de los 4 IRC. El paciente no hemodializado alcanzó un pico máximo de SAF ≤ 26 nmol/l. Conclusiones: se observó ausencia de ritmo diario de cortisol en el 50% de los IRC_h. La respuesta de SAF al estímulo con ACTH permitió detectar insuficiencia adrenal secundaria en un paciente con IRC.

INMUNOLOGIA VII

492. Actividad fagocítica - lítica de polimorfonucleares de Bufo arenarum inyectado con plomo. Carolina E. Rosenberg¹, Marcos A. Arrieta², Nilda E. Fink², Alfredo Salibián^{1,3}.

1: Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, 2: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 3: Universidad Nacional de Luján.

El plomo es un elemento tóxico que afecta diversos aspectos del sistema inmune. Se estudiaron sus efectos en dosis subletales sobre las funciones fagocíticas y líticas de células PMN de *Bufo arenarum* machos (120 g). Los sapos fueron aclimatados 7 días y mantenidos durante los experimentos a fotoperíodo y temperatura constantes (12 D: 12 N, 20°C). Los animales tratados (n=15) se inyectaron con 100 mg Pb. Kg⁻¹ (acetato) y los controles (n=15) con acetato de Na. Se cultivaron *Candida pseudotropicalis* en agar Sabouraud glucosa, se cosecharon y lavaron con Hanks. Se agregó RPMI hasta una concentración de 5×10^6 células/ml. Se opsonizó con 100 ul de una pool de sueros por ml de suspensión de *Cándida*. Siete días después de la inyección se obtuvo sangre sin anticoagular, se la incubó sobre portaobjetos en cámara húmeda, se lavó con RPMI los leucocitos adheridos y se incubó con la suspensión de *Cándida*. Se tiñó con May Grunwald-Giemsa. La actividad fagocítica se expresó como N° de *Cándida* fagocitadas por 100 PMN y la actividad lítica como % de levaduras muertas del total de las fagocitadas. Las plombemias se determinaron por EAA. Las funciones fagocíticas y líticas de los PMN se redujeron en forma significativa (50 % y 10,9 % respectivamente) en los sapos inyectados con Pb. La disminución se correlacionó con la plombemia ($r = -0,66$, $p < 0,001$). Estos resultados podrían ser consecuencia de cambios en la composición lipídica de las membranas, o de una alteración en la regulación de la función inmune producida por el plomo.

493. Anticuerpos contra Galectina-1 en uveítis. Implicancias clínicas. Marta D. Romero, Mercedes, Ferrero, Natalia Rubinstein, Juan C. Muñio, Patricio Juárez, José L. Pinto, Cristina Maldonado y Gabriel A. Rabinovich.

Laboratorio de Inmunopatología, Investigación y Docencia, Fundación Ver, Córdoba. Laboratorio de Inmunogenética, Hospital Clínicas. UBA. Buenos Aires.

Privilegio inmune es un término aplicado a órganos en los cuales diversos mecanismos operan para evitar la respuesta

inflamatoria. Ruptura de este privilegio se observa en procesos oculares como las uveitis en los cuales se instala una respuesta inmune específica contra componentes propios. Los mecanismos postulados para explicar este fenómeno asignan a la apoptosis de células efectoras, un rol protagónico. En trabajos previos demostramos que Galectina-1 (Gal-1) está involucrada en la apoptosis de linfocitos T he lper 1 revirtiendo un proceso artrítico. El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de anticuerpos anti-Gal-1 en pacientes con uveitis y las implicancias clínicas de los mismos. Se investigaron por el método de ELISA anticuerpos contra Gal-1 en 90 sueros de pacientes con uveitis y 30 sueros normales sensibilizando las placas con Gal-1 recombinante purificada. Se detectó una prevalencia significativa de anticuerpos IgG (43,3%), IgA (30%) e IgE (47,7 %) en los pacientes ($p < 0,01$ en todos los casos con respecto a la población normal). Incremento de estos anticuerpos se observó en los estadios críticos de la enfermedad. Sueros de estos pacientes reaccionaron en experimentos de Western Blot con Gal-1 recombinante purificada. Con el objeto de determinar el órgano blanco de estos anticuerpos, la presencia de Gal-1 en ojo humano fue investigada por inmunohistoquímica usando un antisuero heterólogo contra Gal-1. La lectina fue detectada en todas las capas de retina humana. Los resultados obtenidos permiten concluir que los anticuerpos contra Gal-1 detectados en los pacientes con uveitis podrían ser relevantes en la ruptura del privilegio inmune detectados en los pacientes con uveitis, podría ser relevantes en la ruptura del mecanismo de privilegio inmune. relevantes en la ruptura del mecanismo de privilegio inmune.

494. Prostateína (PR) es un importante autoantígeno en el modelo de Prostatitis Autoinmune Experimental (PAE) desarrollado en ratones non-obese diabetic (NOD). Virginia E Rivero, Claude Carnaud, Clelia M Riera.

Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Qcas. Universidad Nacional de Córdoba. e-mail=vrivero@bioclin.fcq.unc.edu.ar

La prostatitis crónica no bacteriana humana es una enfermedad común de la próstata, cuya etiología y patogénesis se conoce muy poco. Los ratones de la cepa NOD desarrollan una prostatitis autoinmune espontánea o posterior a una autoinmunización con extracto prostático (EP) que puede ser considerada modelo experimental de esta patología. Una importante respuesta autoinmune humoral, celular y lesión histológica caracteriza a la prostatitis inducida en nuestro modelo. En el presente trabajo analizamos si PR, la proteína más abundante de próstata ventral es uno de los antígenos importantes en las manifestaciones autoinmunes. Para ello ratones NOD de 6 semanas de edad fueron inmunizados en los días 0 y 15 con EP-CFA (Grupo 1) o PR-CFA (Grupo 2). Además ratones NOD Ko para $\beta 2m/m$ (Grupo 3) y Ko para $\alpha\beta MHCII$ (Grupo 4) fueron inmunizados con EP-CFA. La lesión en próstata se evaluó en forma semicuantitativa observándose reacción inflamatoria en la próstata con índice de lesión de 1,3 (Grupo 1), 0,8 (Grupo 2), 1,0 (Grupo 3) y 0,4 (Grupo 4). Mediante ensayos de ELISA se demostró presencia de IgG anti EP e IgG anti PR sólo en animales de los grupos 1, 2 y 3. Ensayos linfoproliferativos realizados en animales de los grupos 1 y 2 demostraron presencia de células T autoinmunes anti PR. Estos resultados indican que si bien PR es una proteína inductora de PAE, en EP hay otras proteínas que contribuyen al desarrollo de la enfermedad y apoyan la idea de que las células CD4 positivas son necesarias para el desarrollo de prostatitis autoinmune en nuestro modelo.

495. Distribución ultraestructural y regulación de la secreción de galectina-1 de macrófagos residentes, inflamatorios y activados. Gabriel Rabinovich, Cristina Maldonado, Pilar Aoki, Nora Yranzo, Clelia Riera & Claudia Sotomayor.

Inmunología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, Laboratorio de Inmunogenética. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires y Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Córdoba. Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas e Instituto de Investigaciones Bioquímicas "F. Leloir"

En trabajos previos demostramos que macrófagos (MO) peritoneales de rata expresan galectina-1 (Gal-1) en forma dependiente de su grado de activación. Esta proteína reveló propiedades inmunoregulatorias, a través de la inducción de apoptosis de células T efectoras. El objetivo del presente estudio fue investigar la distribución ultraestructural de Gal-1 en MO y la regulación de su secreción por estímulos inflamatorios. A partir de células peritoneales se purificaron: a) MO residentes, b) MO inflamatorios luego de la inyección ip de proteasa-peptona y c) MO activados luego de la estimulación *in vitro* con PMA. Las células fueron fijadas en buffer paraformaldehído-cacodilato y procesada para inmunomicroscopía electrónica. Se observó tinción citoplasmática específica, que se incrementó con el grado de activación celular, en áreas electrodensas a nivel de vesículas y granulos secretorios y en menor grado a nivel de membrana y núcleo. A los fines de evaluar la secreción de Gal-1, se obtuvieron sobrenadantes de cultivos de MO sometidos a diversos estímulos. Los medios condicionados fueron concentrados y procesados para ensayos de Western blot. Estímulos pro-inflamatorios como PMA y TNF- α fueron capaces de inducir un incremento significativo de la secreción de Gal-1 respecto a MO residentes (Ind. de incremento: 2.7 y 2.5 respectivamente; $p < 0,05$). El presente estudio sugiere que luego de la aplicación de estímulos inflamatorios, Gal-1 incrementa su síntesis y es vehiculizada en gránulos hacia el compartimiento extracelular a los fines de ejercer en forma parácrina o autócrina sus efectos inmunoregulatorios.

496. Influencia del catión mercurio (Hg²⁺) en la interacción Célula-Fibronectina (Fn). Marcela Salvarrey, José Moreno, María Svetaz, Alicia Toffi y Ester Saball.

Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. e-mail: sabecar@arnet.com.ar

En trabajos anteriores demostramos: 1) infiltración leucocitaria en glomérulos de rata intoxicadas con HgCl₂ y 2) que el catión Hg²⁺ se une a la Fn (Kd=1.6x10⁻⁴M) induciendo su polimerización y modificando la adhesión de polimorfonucleares (PMN). Con el objeto de estudiar si el Hg²⁺ modifica la unión célula-Fn, se purificó la Fn por afinidad en columnas de gelatina-Sepharosa y se la marcó con isotiocianato de fluoresceína (Fn*). Los PMN adheridos a portaobjetos de vidrio se incubaron con Fn* (0.20 mg/ml), concentración plasmática normal, en ausencia y presencia de HgCl₂ (7 μ M), concentración en plasma de ratas intoxicadas, 30 minutos a 37°C. Los linfocitos (Ls) obtenidos por gradiente de Ficoll-Hypaque en suspensión (2x10⁵ cel./ml) se sometieron a idéntico tratamiento. Finalizadas las incubaciones, las preparaciones se analizaron por microscopía, observándose con ambas células un marcado aumento de la fluorescencia en presencia de Hg²⁺. Los Ls mostraron una fluorescencia homogénea en la superficie celular mientras que la de los PMN se evidenció en el citoplasma. El mismo patrón se repitió en todas las preparaciones ensayadas (n=6). Estos resultados sugieren fuertemente que el Hg²⁺ actuaría a nivel de la interacción Fn-receptor aumentando en los Ls la polimerización inducida por dicha unión y promoviendo en los PMN la internalización de la proteína modificada.

497. Mecanismos involucrados en la inhibición de la apoptosis en leucemia linfática crónica de células B (LLC-B). Romina Gamberale, Jorge Geffner, Mónica

Vermeulen, Analia Trevani, Gabriela Salamone, Mariano Scolnik, Guillermo Arrosagaray y Mirta Giordano.

Servicios de Inmunología y Clínica Médica, Acad. de Medicina. E-mail: mirtagiordano@imaginaria.com.ar

La LLC-B se caracteriza por la lenta acumulación en periferia de linfocitos B monoclonales CD5+, proceso que se atribuye a defectos en la apoptosis. Previamente hemos demostrado que los monocitos y las células NK que acompañan al clon leucémico en circulación son capaces de prolongar la supervivencia de las células LLC-B *in vitro*. Para determinar si el efecto anti-apoptótico involucra factores solubles realizamos co-cultivos de células LLC-B purificadas (LLC-B) y células mononucleares totales (CMT) separadas por una membrana que permite sólo el pasaje de macromoléculas (TransWells). La apoptosis se evaluó por microscopía de fluorescencia a distintos tiempos según la cinética de cada paciente. Los resultados sugieren la existencia de factores solubles capaces de prevenir parcialmente la apoptosis de las LLC-B: %apoptosis de LLC-B co-cultivadas con LLC-B vs CMT: 78vs55, 70vs59, 50vs37, 59vs9, 55vs18, 58vs22. Mediante la utilización de Acs neutralizantes encontramos que, en algunos pacientes, el IFN γ y la IL-4 están involucrados en el efecto anti-apoptótico: Ct: 33 \pm 6%, + anti-IFN γ : 51 \pm 4%, + anti-IL-4: 62 \pm 8%, X \pm ES, n=6, p<0,01 Ct vs tratados. El incremento de la apoptosis *in vitro* de las LLC-B no se asocia con modificaciones en la expresión Bcl-2, Fas o FasL. Estos datos sugieren que la inhibición de la apoptosis en LLC-B por monocitos y células NK involucra más de un mecanismo operativo (factores solubles y por contacto celular) para cada paciente.

498. Desordenes lipídicos y marcado compromiso hepático en ratas infectadas por *C.albicans* y expuestas al estrés. Cecilia Rodriguez, Silvia Correa, Hugo Cejas* y Claudia Sotomayor.

*Bioquímica Clínica, Fac. de Cs. Químicas y *Cat. de Patología. Fac. de Medicina U.N de Córdoba. csotomay@bioclin.fcq.unc.edu.ar*

Las infecciones por algunos microorganismos que producen respuestas complejas en el huésped pueden estar asociadas a alteraciones metabólicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar las modificaciones del metabolismo lipídico durante la infección por *C.albicans* y luego de la exacerbación de la misma como consecuencia de la aplicación de estrés. Ratas Wistar de tres meses fueron infectadas (C) o infectadas y estresadas (CE) y decapitadas 3 días post-tratamiento. Los principales hallazgos fueron: una marcada disminución del colesterol (col) total (pC vs CE<0,01) asociada con una disminución en el col-LDL y un aumento significativo en el col-HDL (pC vs CE<0,05). Estas alteraciones se correlacionaron con una disminución de los niveles plasmáticos de TNF- α en el grupo CE (p<0.03). A nivel hepático, la mayor diseminación fúngica observada en los animales CE (UFC p<0,05), estuvo asociada a una pobre respuesta inflamatoria y una marcada esteatosis. La tinción específica para lípidos (Sudan Black y Sudan Red) reveló pequeños gránulos sudanófilos de tenue tinción y distribuidos en forma difusa en los animales sólo infectados (C), mientras que en los animales CE la vacuolización de los hepatocitos fue irregular y de mayor tamaño, con una franca tinción en el sector periportal. Estos resultados sugieren que un marcado desorden en el metabolismo lipídico y un franco compromiso hepático acompaña la severidad de esta infección observada luego de la exposición al estrés.

499. Interacción entre lipopolisacárido, NFkB y el reloj biológico de mamíferos. Tristán Bekinshtein, Luciano Marpegán, #Mónica Costas, *Martin Ralph y Diego Golombek.

*Univ. Nacional de Quilmes, #LFyBM, FCEN (UBA) y *Dept. Psychol. Zool., Univ. of Toronto. (dgolombek@unq.edu.ar)*

En este trabajo hemos caracterizado los efectos del lipopolisacárido bacteriano (LPS) sobre los ritmos circadianos de

actividad locomotora en el ratón (*M. musculus*), así como sobre la sincronización fótica, la expresión de p50 (del complejo NF-kB) en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ, sede del reloj biológico) y la dependencia temporal de sus efectos comportamentales. La administración de LPS 25 ug/Kg afectó el comportamiento de los animales en forma diferencial a lo largo del día, produciendo un efecto motor inhibitorio de aproximadamente 90 minutos de duración a la hora circadiana 15 (CT 15). El LPS produjo una curva de respuesta de fase de tipo fótica de baja amplitud, con retrasos de fase a CT 15. Pulsos de luz (400-600 lux, 10 min) a CT 15 indujeron retrasos de fase de 152 \pm 31 min, reducidos a 83 \pm 10 min por la previa administración de sulfazalacina (inhibidor de la activación de NF-kB). Luego de la administración de sulfazalacina se observó localización citoplasmática de p50 en células de los NSQ, frente a localización nuclear con el tratamiento LPS+sulfazalacina, evidenciando una activación de NF-kB en el reloj biológico. Estos resultados avalan la presencia de un mecanismo de interacción entre los sistemas inmune y circadiano, como una potencial regulación estricta de su funcionamiento.

REPRODUCCION IV

500. Expresión de receptores de prolactina y estrógenos en glándula mamaria e hígado de ratas durante la gestación y el postparto, efecto del hipertiroidismo.

Silvia M. Varas*, María B. Hapon, Graciela A. Jahn.

*Laboratorio de Reproducción y Lactancia, CONICET, Mendoza y *Cat. De Bioquímica Molecular, Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia, Univ. Nac. de San Luis. email: gjahn@lab.cricyt.edu.ar*

El hipertiroidismo (HT) altera el parto y la lactancia y reduce los receptores de estrógenos (REg) en glándula mamaria (GM) y de PRL en hígado de ratas preñadas a término. Usando RT-PCR semicuantitativo determinamos la expresión de los REg alfa y beta y de RPRL corto y largo en RNAs obtenidos de hígado y GM en ratas vírgenes, en los días 7, 14 y 21 de gestación (G) y 1 y 4 de lactancia (L) en ratas controles y HT (0.25 mg/k T₄, s.c. diarios). En hígado, las expresiones relativas al standard interno S16 del RPRL largo y el REg alfa aumentaron en la gestación y cayeron en el postparto (RPRLlargo, Virg: 1 \pm .1; G7: 2.2 \pm .3; G21: 8.1 \pm .8; L1: 2.7 \pm .2; L4: 3.5 \pm .7; REg alfa: Virg: .4 \pm .2; G7: .2 \pm .1; G21: 1.5 \pm .2; L1: 2.9 \pm .7; L4: 1.1 \pm .2). El HT disminuyó la expresión de los RPRL largo y REg alfa en G21 y los de REg alfa en L1 (HT; RPRLlargo, G21: 4.1 \pm .4; REg alfa G21: .5 \pm .2; L1: 1.5 \pm .4). En GM el RPRL largo aumentó durante la gestación, y el REg beta cayó en la gestación (RPRLlargo, G7: .6 \pm .1; G21: 1.7 \pm .4; L1: 2.4 \pm .4; L4: 2.4 \pm .4; REg beta: G14: 44 \pm 11; G21: 32 \pm 7; L1: 16 \pm 4; L4: 42 \pm 6) y el HT disminuyó los RPRLlargos en GM en G21 (.7 \pm .1) y los REgbeta en L4 (16 \pm 5). No hubo cambios en los otros receptores. El RPRLlargo sería regulado por la gestación y el HT en ambos tejidos, mientras que en hígado lo sería el Regalfa y en GM el REgbeta. Los cambios en la expresión de estos receptores se corresponden con los obtenidos previamente por binding.

501. Apoptosis de las células del túbulo seminífero en el testículo prepuberal humano. Esperanza Berensztein, Virginia Lencinas, Marco Rivarola, Alicia Belgorosky.

Laboratorio de Investigación. Hospital de Pediatría Garrahan. (Fax 43085325)

La función de la activación hormonal en testículo humano en el 1er trimestre de vida no está bien definida. Objetivo: analizar la apoptosis en células de Sertoli (SC) y germinal (GC), durante los períodos neonatal (G1,1-21 días), de activación postnatal (G2,1 a 6 meses-m) y de quietud testicular (G3, 12 a 120 m) en cortes de testículos de necropsia (n=30) y en 3 de cirugía. La apoptosis *in situ* se estudió por un mé-

todo colorimétrico. El índice apoptótico (IA)(número de células positivas respecto de 100 totales) de SC fue menor en G1 (5.1 ± 3.78) que en G2 (24.5 ± 16.3) y G3 (23.9 ± 11.7) $p < 0.05$. Asimismo, el IA de GC fue menor en G1 (18.8 ± 8.12) que en G2 (32.2 ± 7.8) y G3 (36.2 ± 7.98), $x \pm SD$, $p < 0.05$. El IA entre SC y GC fue diferente en G1 ($p = 0.0001$) y en G3 ($p = 0.03$). Se observó un leve incremento en el peso testicular a lo largo de la prepubertad (G1: 0.44 ± 0.21 , G2: 0.50 ± 0.13 y G3: 0.55 ± 0.14 , $x \pm SD$, en gramos). No se observó un cambio en la relación GC/SC entre los grupos (0.87 ± 0.06 , 0.86 ± 0.13 y 0.86 ± 0.21 , G1, G2 y G3 respectivamente). En los tejidos provenientes de cirugía, el IA estuvo dentro del inter valo de confianza del 95%. A partir del mes de vida aumenta la apoptosis en ambos tipos celulares del túbulo seminífero, asociado a un lento aumento del peso testicular, lo que sugiere que habría un aumento simultáneo de la proliferación celular. Los datos sugieren que luego del 1er mes se induce un cambio en la cinética de la división de las SC y las GC que definiría la masa de células germinales disponibles para la maduración sexual.

502. Hexosaminidasa de espermatozoides humanos: localización subcelular y posible función. Silvina Perez Martinez, Jorge Tezón, Patricia Miranda.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires. (pmiranda@dna.uba.ar)

La Hexosaminidasa (Hex) es la enzima que hidroliza los residuos terminales N-acetilglucosamina. Estudios previos de nuestro laboratorio sugieren la participación de la Hex durante la interacción del espermatozoide (E) humano con la matriz extracelular del ovocito, la zona pellúcida (ZP). El objetivo de este trabajo fue determinar la distribución subcelular de la Hex en E humanos. Para ello, muestras de semen provenientes de donantes normospérmicos fueron centrifugadas sobre un colchón de Dextrano y los E obtenidos fueron sometidos a diferentes procesos de extracción. La actividad de Hex fue medida con un sustrato fluorométrico específico. La extracción en medio de cultivo (BWW) liberó el 61 ± 3 % de la actividad total de Hex (viabilidad 81%). Este resultado no se modificó al incluir alta fuerza iónica (0.5 M NaCl) en el medio (68 ± 2 %). El tratamiento con 0.1% Tritón X100, liberó el 87 ± 6 % de la actividad total de Hex. Esta distribución no varió significativamente al extraer E capacitados, aunque se observó un aumento de la actividad total de Hex. Los resultados obtenidos indican que el 60 % de la Hex está asociada debilmente a los E humanos, probablemente a la membrana plasmática, aunque también se encontró una población acrosomal. La localización subcelular de la Hex y su permanencia en E capacitados concuerda con su participación en la unión primaria y/o penetración de la ZP.

503. Factores producidos por una línea de células de la granulosa bovina retrasan la maduración de ovocitos. Mariano Lattanzi, Alejandro Colman Lerner, Guillermo Lanuza, Claudio Santos, Lino Barañao.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. e-mail: lbaranao@dna.uba.ar

El aislamiento de ovocitos de mamíferos de los factores inhibitorios presentes en el folículo induce la reanudación espontánea de la maduración meiótica. En nuestro laboratorio se obtuvo la línea celular clonal BGC-1/A4 con características similares a células de la granulosa de folículos inmaduros. El objetivo del presente trabajo fue determinar si las células BGC-1/A4 modulan la maduración de ovocitos bovinos *in vitro*. Para ello los ovocitos fueron madurados en TCM 199 con 5% FBS y FSH sobre monocapas de células BGC-1/A4 (A4), o cultivos primarios de granulosa (CP), o en ausencia de células (C). En el grupo A4 se observó un retraso de 4 a 6 hs en la maduración meiótica, una inhibición de la expansión del cúmulus inducida por FSH y una significativa disminución en el porcentaje de clivaje y de blastocistos: $19.6 \pm 1.5\%$ con respecto a CP:

$54.2 \pm 8.7\%$ y C: $38.9 \pm 4.7\%$ ($n = 150$, representa 3 experimentos). Estudios previos mostraron que el medio condicionado de BGC-1/A4 inhibe el efecto de FSH en células de la granulosa de rata. Estos resultados sugieren que factores producidos por la línea celular afectarían la maduración meiótica a través de un bloqueo de la acción estimuladora de la FSH sobre las células del cúmulus. La línea BGC-1/A4 parece ser un buen modelo para el estudio de factores reguladores intraováricos, que permitan mejorar la eficiencia de la producción de embriones *in vitro*.

504. Regulación génica del gen de folistatina en células de la granulosa bovina. Mónica Fazzini, Lino J Barañao, Patricia Saragueta.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires.

Las proteínas pertenecientes a la superfamilia del TGF- β (TGF- β s, activinas e inhibinas) modulan la regulación de las células de la granulosa durante el desarrollo folicular. Folistatina (FSP) es una proteína no relacionada estructuralmente, con efectos sobre la diferenciación y la proliferación. El objetivo de nuestro trabajo es estudiar la interacción entre TGF- β 1 y FSP, para lo cual hemos medido los niveles de mRNA de FSP mediante RT-PCR semicuantitativa, en cultivos primarios de células de la granulosa bovinas. La respuesta máxima de estimulación se observó a las 48 hs de cultivo en presencia de 0.3 ng/ml de TGF- β 1. Por otra parte, experimentos preliminares sugerían un efecto estimulador de FSP sobre su propia expresión. Realizamos una curva dosis-respuesta de agregado de FSP exógena obteniéndose la máxima estimulación a dosis de 0.5 ng/ml. Por último, análisis de northern blots confirmaron los resultados anteriores con la aparición de dos bandas correspondientes a las dos especies de 2.8 y 1.8 kb de mRNA de FSP descriptos en bovinos. En conclusión, demostramos que existe regulación positiva de la expresión de FSP por TGF- β 1 en células de la granulosa bovinas, sugiriendo que la modificación de los niveles de FSP podría ser uno de los mecanismos por los cuales TGF- β 1 interviene en la regulación folicular.

505. Regulación diferencial de la secreción de PRL en ratas Wistar e IFL Nu durante la gestación. Graciela A. Jahn, Marta Soaje, Ricardo P. Deis.

Laboratorio de Reproducción y Lactancia, CONICET, Mendoza.

Las ratas IFL Nu responden menos a estímulos de secreción de PRL, como la succión, proestro y gestación temprana, pero la respuesta al stress esta aumentada. Estudiamos el efecto de administración de antagonistas serotoninérgicos (pCPA y ketanserin, Ket), opioides (Naloxone, Nal) en combinación con mifepristone y adrenérgicos sobre la liberación de PRL basal, o inducida por PGF2alfa en los días 19 y 20 de gestación (G19 y G20). pCPA y Ket estimularon la secreción de PRL mucho mas en las ratas IFL Nu (pCPA: 239 ± 32 ; Ket: 49 ± 13 ng/ml) que en las Wistar (pCPA: 74 ± 14 ; Ket: 17 ± 2 ng/ml) en G19. En cambio, la inyección de Nal a ratas tratadas con mifepristone en G19 no modificó los niveles basales de PRL en las ratas IFL (4 ± 2 ng/ml), mientras que los elevó significativamente en las ratas Wistar (basal: 5 ± 1 ng/ml, Nal-RU: 141 ± 24 ng/ml). La PGF_{2 α} elevó los niveles de PRL en ambas cepas (IFL: 131 ± 28 , Wistar: 72 ± 35 ng/ml). Los antagonistas adrenérgicos metoprolol (Met) y prazosin (Prz) bloquearon la respuesta al pCPA o a la PGF2alfa en un 70 % en las ratas Wistar, mientras que en las IFL el Prz no fué efectivo sobre la PGF_{2 α} y el Met menos efectivo sobre el efecto de pCPA. Estos resultados demuestran una sensibilidad diferencial de los mecanismos de liberación de PRL en las ratas IFL Nu durante la gestación.

506. Expresión de canales iónicos en tejido trofoblástico normal y patológico.^{1,2}Alicia Damiano, ¹Elsa Zotta, ³Susana Genti-Raimondi, ³Sandra Durand, ¹Jorge Goldstein, ^{2,4}Horacio Cantiello, ^{1,2}Cristina Ibarra

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, ²Laboratorio de Canales Iónicos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, ³Departamento de Bioquímica, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba ⁴Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School. e-mail: ibarra@fmed.uba.ar.

La mola hidatidiforme completa (MHC) es una enfermedad placentar no invasiva originada por anomalías genómicas. El fenotipo molar comienza con hiperplasia trofoblástica y la acumulación de líquido que lleva al edema y a la formación de vesículas traslúcidas que se asemejan a racimos de uva. El objetivo de este estudio fue identificar la expresión y localización del canal aniónico regulador de la conductancia de la fibrosis quística (CFTR), y la del canal catiónico tipo APXL en el tejido trofoblástico normal y patológico. El ARN total se purificó a partir del trofoblasto de 1er y 3er trimestre de placenta humana normal (PHN) y MHC. Mediante la técnica de RT-PCR, utilizando oligonucleótidos «primers» que flanquean zonas conservadas del exon 24 del CFTR y de los dominios I y III del APXL, en todos los casos se amplificaron las bandas del tamaño esperado. La localización del CFTR con anticuerpos monoclonales reveló una leve marcación en el citotrofoblasto de PHN tanto del 1er como del 3er trimestre. En MHC, en cambio, se observó una marcación específica en la superficie de las vesículas hidrópicas principalmente en las más pequeñas que tienden a agregarse. La marcación del APXL con un anticuerpo policlonal dirigido contra el carboxilo terminal reveló una clara localización en cito y sincicio trofoblasto de PHN de 1er y de 3er trimestre respectivamente. En MHC, sin embargo, sólo se observó una importante marcación de APXL en el sinciotrofoblasto. La expresión y localización diferenciales de CFTR y APXL, canales iónicos que a su vez regulan la función de otros canales, en molas hidatidiformes ayudaría a entender el mecanismo de acumulación de líquidos observado en esta enfermedad del trofoblasto humano.

507. Niveles de PGE₂ en embriones de rata sana y diabética durante la organogénesis: efecto modulador de la enzima superóxido dismutasa. Verónica White, Alicia Jawerbaum, Débora Sinner, Carolina Pustovrh, Martha Gimeno, Elida González.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. CONICET. a.jawerbaum@abaconet.com.ar

Se estudia una posible interrelación entre el daño inducido por radicales libres de oxígeno (RLO) y niveles intraembrionarios disminuidos de PGE₂ en el embrión (Emb) de rata diabética (D), determinando el efecto de adiciones de SOD sobre los niveles de PGE₂ en el Emb de rata sana (C) cultivado *in vitro* 24 hs (explantado día 10) en presencia de suero diabético (SD) y en el Emb C y D en el día 11 de gesta. La diabetes se induce por estreptozotocina (60 mg/kg) en ratas adultas. El contenido de PGE₂ (en pg/ug proteína Emb) está disminuido en el Emb C cultivado en presencia de suero diabético (SD) en relación al control (SC) (SC: 2.2 ± 0.3; SD: 0.9 ± 0.4 p<0.05). Adiciones de SOD (1000 U/ml) incrementan el contenido de PGE₂ en dichos cultivos (SOD: SD: 6.2 ± 0.9; SC: 5.5 ± 0.6 p<0.001 vs sin adiciones). En Emb de día 11 de gesta se determina la liberación al medio de PGE₂ y sus niveles intraembrionarios. Los Emb D poseen menor contenido intraembrionario (I) de PGE₂, y está incrementada la liberación (L) al medio de incubación. (IC: 2.5 ± 0.4; ID: 1.5 ± 0.1 p<0.05; LC: 2.5 ± 1.4; LD: 60 ± 6.0 p<0.001). Adiciones de SOD 1000 U/ml disminuyen la liberación de PGE₂ al medio de incubación e incrementan los niveles de PGE₂ del Emb (ID + SOD: 2.4 ± 0.2 p<0.001 vs ID; LD ± SOD: 33.0 ± 4.0 p<0.005 vs LD). De esta forma observamos que SOD es capaz de evitar las anomalías en la acumulación y liberación de PGE₂ en

el Emb D, alteraciones que se relacionan con la aparición de malformaciones congénitas.

FARMACOLOGIA III

508. Relación entre la actividad anticoagulante y la actividad anticomplementaria de la heparina. Graciela Calabrese, Francisco Leocata, Eduardo Recondo y Marta Fernández.

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica y Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. (mrecondo@huemul.ffybu.uba.ar).

La heparina posee una gran variedad de actividades biológicas, entre las que se destacan sus actividades anticoagulante y anticomplementaria. Como los resultados sobre la relación existente entre estas dos actividades, son contradictorios, el objetivo de este trabajo es tratar de establecer si ambas dependen del mismo sitio de la molécula del glicosaminoglicano (GAG), o si existen sitios diferentes para cada una de ellas. Para eso: (1) se aisló la fracción de heparina con mayor actividad anticomplementaria, por interacción de heparina comercial de alto peso molecular con el primer componente del sistema del complemento humano en condiciones muy específicas de pH, a muy baja fuerza iónica y en presencia de iones calcio; (2) se analizó la afinidad por la antitrombina de la heparina total y de las fracciones aisladas en el paso anterior, mediante cromatografía de afinidad con Antitrombina III-Sepharosa. Se comprobó que la fracción de la heparina con mayor afinidad por el C1 (que se aísla en el precipitado de la interacción) representa el 23% de la heparina total original, tiene mayor actividad anticoagulante específica (402.33 ± 166.5 U/mg; P<0.01 Test de Dunnett) que la heparina original (170 U/mg), y se aísla en la fracción con mayor afinidad por la AT-III (eluye con ClNa 0,6 ± 0,2 M). Estos resultados indican que existe identidad entre el sitio responsable de la actividad anticoagulante y el responsable de la actividad anticomplementaria.

509. Respuesta de la vasculatura renal al agonista GABA_B, baclofen (BAC), en presencia de enalapril. Liliana Monasterolo, Verónica García, Mónica Elías.

Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. CONICET. e-mail: vgarcia@fbioyf.unr.edu.ar

En trabajos anteriores hemos descripto que BAC provoca un aumento de la presión de perfusión (PP) renal y de las excreciones fraccionales de agua y sodio. Se demostró la participación de receptores AT₁ en el incremento de la resistencia vascular inducida por BAC y la capacidad de éste de potenciar la respuesta a angiotensina II. En este trabajo se profundizó el estudio de los mecanismos involucrados en el efecto vasoconstrictor de BAC. Se utilizó el modelo de riñón aislado y perfundido de rata. Luego de 30 min de estabilización (control) se estudiaron los efectos sobre PP a flujo constante de BAC (0.05-500 uM, n:7) y de BAC en presencia del inhibidor de la ECA, enalapril 1 uM (ENA+BAC, n:7) o de furosemida 74 uM (FURO+BAC, n:3). Se calcularon los % de cambio relativos al control. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. El efecto vasoconstrictor de BAC se encontró inhibido por enalapril y por el bloqueo farmacológico de la retroalimentación tubulo-glomerular (RTG) inducida por FURO (PP % cambio: BAC_{200uM}: 14.1 ± 1.5, ENA+BAC_{200uM}: 7.3 ± 1.7*, FURO+BAC_{200uM}: 3.8 ± 1.5*; *p<0.05 vs. BAC_{200uM}). Estos datos indican que la respuesta presora mediada por receptores GABA_B requiere la integridad de la vía renina-angiotensina y de los mecanismos de RTG.

510. Regulación de la actividad de óxido nítrico sintasa por tirosinas quinasas en glándula submaxilar murina. Alejandro Español, María Sales.

Área Investigación, Instituto de Oncología Angel Roffo. Buenos Aires. (mesales@mail.retina.ar)

Ha sido descrito que la glándula submaxilar murina (GSM) sintetiza citoquinas responsables de la activación y proliferación celular en condiciones fisiológicas y patológicas. Demostramos que el IFNg estimula en forma concentración dependiente la secreción de amilasa salival (AS) (mg maltosa/min.g.tej.húm) (basal:1,25±0,01; IFNg: 2,51±0,02) (n=9) en forma análoga al agonista muscarínico carbacol (CARB) (2,00±0,04) (n=9). Ambos efectos fueron bloqueados por atropina (10⁻⁵ M) y genisteína (GEN) (30ug/ml) (IFNg: 1,26±0,02; CARB: 1,29±0,04) (n=6). Además el efecto máximo producido por IFNg (10 U/ml) es inhibido parcialmente por L-NMMA (10⁻⁴ M) (1,47±0,01) (n=6). Observamos que la producción basal de óxido nítrico (NO) medido como nitrito (uM /gr tej.húm.) es estimulada sólo por IFNg (basal: 61±3; IFNg 147±5; CARB 50±5) (n=6) siendo dicho efecto bloqueado parcialmente por GEN (94±3) (n=6). Por Western blot detectamos la presencia de las isoformas 1 y 3 de la óxido nítrico sintasa (NOS) y utilizando anticuerpos anti-fosfotirosina observamos que el IFNg (10 U/ml) produce la fosforilación de dos proteínas cuyos Rf coinciden con las isoformas mencionadas (OD/mm²) (NOS1: basal: 0,916±0,012; IFNg 2,660±0,101, NOS3: basal: 0,722±0,019; IFNg 1,056± 0,084) (n=2). Concluimos que el IFNg estimula la secreción de AS en forma NO dependiente y que dicho efecto es debido a una regulación positiva ejercida por tirosinas quinasa.

511. Efecto de una o-naftoquinona antitumoral, sobre la cadena respiratoria mitocondrial, en hígado de rata. Natacha de Witte, Marta Dubin y Andrés Stoppani.

Centro de Investigaciones Bioenergéticas (CONICET), Facultad de Medicina (UBA). Tel/Fax: 54 11 4508-3680. e-mail: natachawitte@yahoo.com

La Beta-lapachona, o-naftoquinona, tiene actividad tripanocida e inhibe la topoisomerasa I en células humanas y la expresión de los genes dirigida por HIV-1 LTR (Li y col. Cancer Res. 55: 3712, 1995). La CG 9-442 (CG), análoga de la Beta-lapachona, fue sintetizada como posible agente antitumoral (Schaffner-Sabba y col., J. Med. Chem. 27:990, 1984). Se demostró que la CG inhibe la cadena respiratoria, produce un ciclo redox a nivel del complejo I de la misma y un efecto desacoplante (de Witte y col., SAIB 1997 y 1998). Con el objeto de dilucidar el/los sitio/s de inhibición de esta quinona, en este trabajo se midieron las actividades NADH oxidasa (NOx), NADH deshidrogenasa (ND), succinato deshidrogenasa (SD), succinato ubiquinona óxido-reductasa (SUOXr), NADH-citocromo c reductasa (CR) y citocromo c oxidasa (COx) (espectrofotométricamente); y succinato oxidasa (SOx) (polarográficamente), en partículas submitocondriales de hígado de rata, preincubadas en presencia de CG, durante 15 minutos a 30°C. Considerando que: a) la cadena respiratoria completa (NOx y SOx), fue inhibida por la CG 50 uM (77% y 54% respectivamente; p<0,01; n=3); b) la inhibición de NOx fue revertida por el agregado de citocromo c; c) SD y SUOXr fueron inhibidas por la CG 50 uM, aproximadamente en un 10% en ambos casos (p<0,05; n=4) y d) ND, CR y COx no fueron afectadas; podemos sugerir que la CG inhibe el transporte de electrones en dos sitios de la cadena respiratoria mitocondrial: succinato deshidrogenasa y citocromo c.

512. Protección con enalapril y losartan de las lesiones cardiovasculares asociadas al envejecimiento de la rata. Felipe Insera, Hernán Gómez Llambí, Inés Stella, Norberto Terragno, León Ferder, Nidia Basso.

Instituto de Investigaciones Cardiológicas – Universidad de Buenos Aires - CONICET. (expneph@fibertel.com.ar)

Objetivos: Evaluar el efecto de losartan (L) o enalapril (E) sobre la fibrosis cardíaca y la hipertrofia cardiovascular edad en

rata añosa. Materiales y Métodos: Ratas Wistar macho (n=24) recibieron desde el destete y durante 18 meses: agua (Control: C), L o E: 10 mg/kg/día en el agua de bebida. Se extrajo el corazón y la aorta, se pesaron, se fijaron y se tiñeron con H&E y tricrómico de Masson. Se evaluó con score semicuantitativo de 0 a 4 fibrosis miocárdica (FM) y fibrosis pericoronaria (FPC). Se realizó por MO a 100X en 20 campos ópticos para cada miocardio. La pared aórtica se midió, con un ocular graduado, tomando dos puntos opuestos en el mismo nivel aórtico. Las diferencias con el C se analizaron con ANOVA.

	Control (n=8)	Losartan (n=8)	Enalapril (n=8)
Peso Cardíaco (g)	1.82±0.07	1.60±0.05*	1.54±0.04*
Peso Vent. Izq. (g)	1.34±0.07	1.18±0.04*	1.10±0.05*
FM	1.63±0.58	1.69±0.59	0.50±0.59*
FPC	1.00±0.53	0.75±0.71	0.44±0.32
Peso aorta (mg)	288±16	215±30*	171±7*
Pared aórtica (u)	60.5±7.01	54.4±3.92	47.9±2.35*

*p<0.05 vs. Control.

Conclusiones: La inhibición crónica de la enzima de conversión evita los cambios cardiovasculares propios de la edad. En la dosis utilizada, el bloqueo AT1 fue parcialmente efectivo.

513. Participación de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAP quinasa) en la respuesta contráctil a cininas en vena umbilical humana. Pablo Sardi, Virginia Pujol-Lereis, Mauro Gobbi, Wanda Nowak, Rodolfo Rothlin.

III Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. (e-mail: farmaco3@fmed.uba)

En vena umbilical humana (VUH) hemos descrito por estudios funcionales la presencia de receptores a cininas B₁ y B₂ (Sardi et al., Eur. J. Pharmacol. 1997, 321: 33-38). El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de las MAP quinasa en la respuesta contráctil mediada por estos receptores. Para ello, se emplearon anillos de VUH en solución de Krebs a 37 °C, pH 7,4, burbujeados con carbógeno. Se realizaron curvas concentración respuesta (CCR) a des-Arg⁹-bradicinina (des-Arg⁹-BK, agonista selectivo B₁) o a BK (agonista B₂) en ausencia o presencia (30 min antes de la CCR) de diferentes inhibidores. Genisteína (10 uM), inhibidor de tirosina quinasa, antagonizó la respuesta a des-Arg⁹-BK sin afectar el máximo (pCE₅₀, control:7,36 ± 0,06g, tratado: 7,00 ± 0,05g, n=6, p<0,05). Además, U-0126 (1uM) y PD-98059 (10uM), inhibidores de MEK 1, disminuyeron las respuestas máximas mediadas por el agonista B₁ (control:11,5 ± 1,4g, U-0126: 4,2 ± 2,5g, n=5, p<0,05; control:14,4 ± 2,5g, PD-98059:11,0 ± 2,4g, n=6, p<0,05). SB-203580 (10 uM), inhibidor de p38, también disminuyó la respuesta máxima a des-Arg⁹-BK (control:16,6 ± 1,6g; tratado: 12,3 ± 1,3g, n=7, p<0,05). Por otro lado, ninguno de los tratamientos modificó la CCR al agonista B₂, BK. Estos resultados sugieren que en el acoplamiento del estímulo de los receptores a cininas B₁ en VUH estarían involucradas las MAP quinasa, MEK 1 y p38.

514. Vena umbilical humana: evidencia funcional de la presencia de una población heterogénea de receptores serotoninérgicos. Rogines-Velo María Pía, Pelorosso Facundo G., Zold Camila L., Brodsky, P. Tamara, Rothlin Rodolfo P.

3° Cátedra de Farmacología. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. (e-mail: farmaco3@fmed.uba.ar)

La serotonina (5-HT) es un potente agente vasoconstrictor en vena umbilical humana (VUH). El objetivo de este trabajo fue caracterizar los receptores serotoninérgicos involucrados en la respuesta vasoconstrictora a este agonista en VUH. Se obtuvieron cordones umbilicales de embarazos normales. Se disecaron anillos de VUH y se montaron bajo tensión isométrica

en solución de Krebs a 37°C, pH 7,4 y burbujeada con carbógeno. Luego de un período de estabilización de 2,5 h, se obtuvieron curvas concentración respuesta (CCR) a diferentes agonistas en ausencia y presencia de ketanserina (antagonista selectivo 5-HT_{2A}): 5-HT (pCE₅₀=8,46; pA₂=9,67), alfa-metil-5-HT (a-Me-5-HT, agonista no selectivo 5-HT₂, pCE₅₀=8,00; pA₂=9,13), 5-carboxamidotriptamina (5-CT, agonista no selectivo 5-HT₁, pCE₅₀=8,11; pA₂=9,07) o L-694247 (agonista selectivo 5-HT_{1B/1D}, pCE₅₀= 8,90; pK_b=6,16). El orden de potencias obtenido para los agonistas utilizados fue : L-694247 >5-HT > 5-CT= a-Me-5-HT; siendo sus respuestas máximas respectivas: 13,82 g, 14,86 g, 14,88 g y 13,25 g. Ketanserina bloqueó de manera competitiva las respuestas contráctiles a 5-HT, a-Me-5-HT y a 5-CT y los valores de pA₂ obtenidos son consistentes con una población de receptores 5-HT_{2A} en VUH. Por otro lado, la eficacia y alta potencia de L-694247 y el pK_b de la ketanserina frente a este agonista sugieren la presencia de receptores 5-HT_{1B/1D} en este tejido.

515. Variaciones diarias en el efecto convulsivante de inhibidores de la GAD y anticonvulsivante de neuroesteroides. Gabriela Naum, Julián Cardozo, M. Fernanda Rubio, Diego Golombek.

Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. (dgolombek@unq.edu.ar)

El GABA es el principal neurotransmisor del sistema circadiano, y su acción está sujeta a variaciones diarias y circadianas. En este trabajo examinamos los ritmos en el efecto proconvulsivante de la inhibición de la glutámico decarboxilasa (GAD) en hámsters (*Mesocricetus auratus*) y el efecto anticonvulsivante de la androsterona, un neuroesteroide que modula positivamente el receptor GABAérgico. La administración i.p. de 10-60 mg/Kg de ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA, inhibidor de la GAD) indujo convulsiones en los hámsters (que fueron analizadas de acuerdo a una escala ad-hoc de severidad de la respuesta), con un menor umbral de sensibilidad a las 24.00 h. Por otra parte, durante la noche se observó que la latencia a la respuesta convulsiva (tanto la primera como la máxima respuesta) fue significativamente más corto. La androsterona (40 mg/Kg) produjo una inhibición total de las convulsiones inducidas por 3-MPA (40 mg/Kg) a las 1200 h, mientras que produjo una inhibición parcial (alrededor del 60%) a las 2400 h. Estos resultados avalan la importancia de la regulación temporal de la modulación GABAérgica en el sistema nervioso central.

HEMATOLOGIA IV

516. Estado nutricional con respecto al Hierro en el período perinatal en un grupo de mujeres. Silvia Langini¹, Silvana Fleischman², Araceli Lazzari³, Michael Crane⁴, Carlos Ortega Soler⁵, María Luz de Portela⁶, Bo Lonnerdal⁶.

¹Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. ²Hospital Diego Paroissien, La Matanza (Buenos Aires) ³Departamento de Nutrición. Universidad de California, Davis (USA). (slangini@ffyb.uba.ar)

Los cambios fisiológicos durante el período perinatal dificultan el diagnóstico de anemia por deficiencia de Hierro (Fe) en la puérpera. Por ello, se estudió el estado nutricional del Fe en 17 mujeres primíparas (edad gestacional 39±3 semanas) asistidas por partos normales en el Hospital D. Paroissien. Se obtuvo una muestra de sangre venosa a la internación (Mo), y en un subgrupo (Sg) (n=8) 48 h después del parto (Mf). En sangre entera se determinó: Hematocrito (Hto), Hemoglobina (Hb) y recuento de Glóbulos Rojos (GR) mediante un contador electrónico; Porphirina Eritrocitaria (PE) (Piomelli); en suero: Ferritina (FS) (IRMA, DPC) y Receptor Soluble de Transferrina (RsT) (ELISA, Ramco Laboratories). A Mo, el por-

centaje de mujeres con valores bioquímicos anormales fue: Hb (g/dL)< 11: 29.4; PE (ug/dLGR)>70:11.8; FS(ng/mL)<10: 11.8; RsT (ug/mL)> 8.3: 11.8. En Sg, existió diferencia significativa (p<0.05) entre Mo y Mf, para (X±SD): Hto (%): 37±3; 33±4; Hb (g/dL):12.3±1.6; 10.6±1.3; GRx10⁹/mm³: 4020±338; 3570±388; RsT (ug/mL): 4.6±1.7; 3.7± 1.7; no para FS (ng/mL): 61±60; 68±51. La Hb no correlacionó con FS ni con RsT a Mo y Mf; FS y RsT no correlacionaron a Mo, pero sí a Mf (r = - 0.683). Estos resultados sugieren la utilidad de FS y RsT para evaluar el estado nutricional con respecto al Fe en el post- parto inmediato. *Financiado por UBA, TB060*

517. Rol del óxido nítrico en el crecimiento de megacariocitos. Mirta Schattner*, Roberto Pozner*, Natalia Bettini*, Norma Maugeri*, Ricardo Gomez# y Maria Lazzari*.

**Departamento de Hemostasia y Trombosis, Academia Nacional de Medicina. #Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. (schattne@mail.retina.ar)*

Previamente demostramos que dadores de óxido nítrico (ON) suprimen el crecimiento de megacariocitos (Mks). En este trabajo analizamos si la inhibición estaba asociada a la inducción de apoptosis y la acción del ON endógeno. La adición de DETA-ON (125uM), a células CD34⁺ de médula ósea humana en el día 1 u 8 post estimulación con trombopoyetina produjo luego de 96 horas, 52±2 y 72±2 % (n=3) de apoptosis (control 7±2 y 18±1 % respectivamente) determinada por tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina. La preincubación de células CD34⁺ con L-NAME (inhibidor de la síntesis de ON) aumentó la generación de Mks (identificados por citofluorometría como células positivas para CD41 y expresados como la X±ES (x10³), n=4) (473±27 vs. 364±14 p<0.05) y revirtió la inhibición inducida por L-arginina (458±62 vs. 296±5). El crecimiento de Mks a partir de cultivos de células mononucleares (CM) disminuyó cuando las CM fueron tratadas con TNF + Interferón-gamma en presencia de L-arginina (243±9 vs. 64±3 p<0.01). La inhibición fue revertida parcialmente por la preincubación de las células con L-NAME o L-NMMA (94±9 y 163±5). Los resultados indican que el ON generado tanto por fuentes exógenas como endógenas es capaz de inhibir la producción de Mks. La inducción de apoptosis en progenitores y células maduras estaría involucrada en el mecanismo de inhibición.

518. Efecto de neurotrofinas en células endoteliales. Roberto Pozner*, Mirta Schattner*, Sara Litwak*, Norma Maugeri*, Ricardo Gómez# y Maria Lazzari*.

**Departamento de Hemostasia y Trombosis, Academia Nacional de Medicina. #Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. (schattne@mail.retina.ar)*

El uso de neurotrofinas (NT) para el tratamiento de la neuropatía diabética (ND) se encuentra en ensayo clínico de fase III. Las NT se expresan en células del sistema nervioso y en otras incluyendo endoteliales (CE). Dado que alteraciones en la activación del endotelio juegan un rol central en la patogenia de la ND, estudiamos el factor de crecimiento nervioso (NGF), la NT-3 y el factor nervioso derivado de cerebro (BDNF) en CE umbilicales humanas. Los resultados se analizaron utilizando el estadístico t para datos pareados y se expresan como la X± ES de 6 experimentos.

	Control	BDNF	NT-3	NGF
vW basal (ng/mL)	424±42	352±84	419±58	389±70
vW inducido (ng/mL)	14±2	15±1	17±2	13±2
PGI ₂ inducida (ng/mL)	5±1	4±1	5±1	5±1
VCAM-1 basal (UF)	7±1	7±1	6±1	7±1
VCAM-1 inducida (UF)	32±8	38±9	36±7	38±10
ICAM-1 basal (UF)	16±3	18±3	15±4	11±3
ICAM-1 inducida (UF)	122±4	131±8	125±4	122±9

El tratamiento de CE por 16 Hs. con las NT (100-0.01ng/mL) no modificó significativamente el valor del control basal o inducido por trombina (0.5U/mL) (3 min) de factor von Willebrand (vW) y prostaciclina (PGI₂) (ELISA), como así tampoco la expresión (u-nidades de fluorescencia(UF) basal o inducida por TNF (1ng/mL) de VCAM-1 e ICAM-1 (citofluorimetría). Los resultados sugieren que las NT no modulan las funciones del endotelio normal.

519. Eritropoyesis basal y estimulada en ratas con diabetes experimental. Máximo Giglio^a, María Norese^b y Carlos Bozzini^b.

Cátedra de Patología y Clínica Bucodental^a y de Fisiología^b. Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. Fax: 4508-3958.

La revisión bibliográfica carece de evidencias concordantes en relación a la eritropoyesis (E) en pacientes y modelos experimentales diabéticos. La presente investigación fue destinada a evaluar la E en ratas Wistar hembras, que recibieron una dosis de 80 mg. Kg⁻¹ de estreptozotocina a T0. El período experimental duró 30 d, realizándose determinaciones cada 48 h y al término del mismo. Las ratas diabéticas (D) mostraron disminución del peso corporal, hiperglucemia e hiperfagia a T30, no observándose diferencias significativas entre C y D en concentración de creatinina, urea y hemoglobina y en consumo de O₂ basal. Las volemiás globular roja y plasmática, no mostraron diferencias significativas entre los grupos. No hubo diferencia significativa entre C y D en relación con la concentración plasmática de EPO (pEPO), en normoxia, pEPO fue significativamente menor en D en condiciones de hipoxia hipóxica o anémica y en respuesta a Co. La relación dosis/respuesta para rHuEPO en ratas C y D con policitemia post transfusional mostró un desplazamiento derecho en las ratas D. Los resultados obtenidos sugieren que la rata diabética, con función renal exocrina normal, no presenta alteraciones evidentes en la E en condiciones estables. Su capacidad de respuesta a condiciones de estrés eritropoyético, sin embargo, se encuentra seriamente afectada (menor secreción estimulada de EPO y menor respuesta eritroide a dosis altas de EPO exógena).

520. Evaluación de la proteasa que cliva al factor von Willebrand (vWf) independientemente del vWf. Ana Kempfer, María Amaral, Cristina Farías, María Silaf, Gonzalo Carballo, María Lazzari.

Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. CONICET.. kempfer@connmed.com.ar

El método publicado (A) para cuantificar la proteasa que cliva al vWf consiste en: a) dilución de la muestra incógnita 1/20 y las muestras de referencia desde 1/20 a 1/640 b) activación de la proteasa 5 min 37 °C en presencia de bario c) agregado de 1 U/mL de vWf purificado d) siembra de las muestras sobre filtros de nitrocelulosa suspendidos en una solución de urea (despliegue del vWf) e) incubación 24h a 37°C y f) análisis multimérico para evaluar el efecto de la proteasa sobre el vWf purificado. En nuestros experimentos, utilizando el método A, no observamos actividad proteásica en 6 plasmas normales desde la dilución 1/40. Como a diluciones menores de 1/20 se detectan además las posibles anomalías del vWf de la muestra, se ultrasonificaron (20Kc y 60 W, durante 20 min) los plasmas para degradar los multímeros grandes e intermedios del vWf, conservando sólo la actividad proteásica. Se utilizó el método A y el método B (por perfusión), para desplegar el vWf para determinar la actividad proteásica en un paciente con púrpura trombocitopénica trombótica. Se concluye que para cuantificar la proteasa independientemente del vWf se requiere la ultrasonificación del plasma. El patrón multimérico del vWf purificado con la dilución 1/5 del paciente coincide con el de la dilución 1/20 de las curvas de referencia (métodos A y B), por lo que la actividad proteásica del paciente es de 25% (n=4).

521. Valoración del porcentaje de fibroblastos que expresan las proteínas c-Fos y c-Myc en médulas óseas (MO) de pacientes con cáncer avanzado de pulmón (PCP) y mama (PCM), libres de tratamiento. Erica Hofer, Alba Honegger, Tomás Angelillo Mackinlay, Diego Angelillo Mackinlay, Leonardo Mc Lean, Eduardo Bullorsky, Norma Chasseing.

Instituto de Biología y Medicina Experimental y Servicios de Tórax, Mama, y Hematología del Hospital Británico, Buenos Aires. Email: Chasseing@ibyme.dna.uba.ar. Presentado por la Dra. Barañao Rosa I.

En trabajos previos observamos una deficiente capacidad de proliferación del progenitor fibroblástico de MO en PCP y PCM, libres de tratamiento. Por esta razón, se estudió en los cultivos primarios de MO de estos pacientes el % de fibroblastos (Fb) que expresan c-Fos y c-Myc, las cuales están asociadas al proceso de proliferación. Se incubaron 5x10⁵ células mononucleares de MO en medio alfa con 20% de SBF, y al alcanzar confluencia se arretaron por 72 horas. Luego, las células adherentes (90% Fb, fosfatasa alcalina y prolil 4-hidroxilasa +) se aislaron con tripsina-EDTA. 10⁵ Fb aislados fueron incubados en PBS en presencia o no de 10% de SBF durante 60 min, realizándose la cuantificación del % de Fb que expresan ambas proteínas por inmunocito-química. **Resultados:** las células estromales (>% Fb) de MO de los PCP y PCM presentaron un aumento en los días que tardan para alcanzar confluencia respecto al grupo control (p<0,001 y <0,01, resp.). Además, estos cultivos de los PCP y PCM tuvieron un menor n° de Fb en comparación al valor normal (p<0,02 y 0,05, resp.). Respecto al % de Fb que expresan c-Fos y c-Myc se observó: *Sin SBF*= c-Fos para PCP=23,1± 8,4; PCM= 20,9± 4,5; y normal =61,4 ±2,4 (vs. PCP y PCM p<0,01) y c-Myc para PCP =59,6± 9,8; PCM= 49,8±6,8; y normal =71,8 ±3,1 (vs. PCM p<0,05) y *con 10% de SBF* = c-Fos para PCP=39,4± 6,7; PCM= 35,5±3,1; y normal =72,8 ±4,8 (vs. PCP p<0,02 y vs. PCM p<0,01) y c-Myc para PCP=58,3± 9,4; PCM=78,3±7,9; y normal =90,6 ± 2,3 (vs. PCP p<0,05). **Conclusión:** Los cultivos de MO de los PCP y PCM presentaron un aumento del tiempo para alcanzar confluencia, así como una disminución del n° de Fb confluentes. Observaciones que podrían ser consecuencia de una disminución del % de Fb que expresan las proteínas c-Fos y c-Myc.

522. Estudio de la infección por el virus de Epstein Barr (EBV) y su asociación con la expresión de los oncogenes p53 y bcl-2 en linfomas no Hodgkin (LNH) pediátricos. ¹Paola Chabay; ²Elena De Matteo; ¹Saúl Grinstein; ¹María Preciado.

¹Laboratorio de Virología, ²Servicio de Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (e-mail: virologia.hnrg@usa.net)

Los linfomas representan el 10% de las neoplasias en pediatría, siendo LNH el 60%. La distribución por edad de los LNH presenta una curva ascendente con un pico entre los 20 y los 40 años, y los <16 años representan el 3% del total. Una fuerte asociación de ciertos LNH y EBV así como la sobreexpresión de los oncogenes p53 y bcl-2 han sido descriptas en LNH de adultos. Por ello nos propusimos estudiar la expresión de EBV, p53 y bcl-2 en nuestra población pediátrica con LNH. Se estudiaron 16 pacientes con LNH, 3 de ellos HIV+ (5 anaplásicos a grandes células-B, 1 Ki-1+, 5 indiferenciados a pequeñas células no clivadas tipo Burkitt, 2 tipo no Burkitt, 2 linfoblásticos, 1 de sistema nervioso central) tratados en el Htal. de Niños R. Gutiérrez. Rango de edad 3-16 años (mediana 12), 10 varones y 6 mujeres. Sobre cortes de biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina se investigó la presencia de EBERs por hibridización *in situ* y LMP-1 por inmunohistoquímica para EBV; y p53 y bcl-2 por esta última técnica. Se observó un 25% EBERs + en el núcleo de las células tumorales y un 44% LMP-1+ en su citoplasma. El 100%

de los LNH en pacientes HIV+ fueron EBV+. Un 81% de los casos fueron p53+, con el 50% de ellos mostrando >50% de células tumorales positivas, mientras que el 25 % fueron bcl-2+, la mayoría con <25% de células positivas. Conclusión: 1) la asociación con EBV es del 25% para los LNH pediátricos estudiados, mientras que para los casos HIV+ es del 100% 2) la sobreexpresión de p53, a diferencia de bcl-2, tendría un rol en el proceso de linfomagenesis de LNH pediátricos, 3) la co-expresión de p53 y EBV (p=0,06) debería estudiarse como factor pronóstico de la evolución en un número mayor de pacientes.

523. Actividad de telomerasa en líneas celulares hematopoyéticas expuestas a radiaciones ionizantes: efecto de la dosis, tasa de dosis y calidad de la radiación. María del Rosario Pérez (#), Francois Leteurre (*), Diana Dubner (#), Severino Michelin (#), Pablo Gisone (#) y Edgardo Carosella (*)

(#) Laboratorio de Radiopatología. Gerencia de Apoyo Científico. Autoridad Regulatoria Nuclear, Buenos Aires, Argentina pgisone@cae.arn.gov.ar (*) Service de Recherches en Hemato-Immunologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, Commissariat à l'Energie Atomique, France

El objeto del presente trabajo es el estudio de los efectos radioinducidos sobre la actividad de telomerasa en células hematopoyéticas. Suspensiones celulares de la línea KG1a fueron irradiadas con una fuente gamma (Co60, dosis 0 a 5 Gy, tasas de dosis 0,025 Gy/min, 0,3 Gy/min y 1,57 Gy/min) y campo mixto neutrón-gamma (5Gy) Se evaluó la viabilidad celular por exclusión con azul tripan y se determinó la actividad de telomerasa hasta 24 hs post-irradiación (p.i.) mediante el ensayo TRAP. Se evaluó la relación dosis-respuesta para las distintas tasas de dosis y calidad de la radiación. La actividad de telomerasa en relación a los controles mostró un valor máximo a las 24 hs en las muestras irradiadas con 3 Gy, fuente gamma (alta tasa: 3,6 +/- 0,7, tasa intermedia: 3,07 +/- 0,7 y baja tasa: 1,86 +/- 0,5). No se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular. En las muestras irradiadas con campo mixto se observó un descenso temprano en la actividad de la enzima (15 minutos p.i.: 0,55±0,08) alcanzando valores máximos a partir de 4 hs p.i.(3,3±0,6) siendo la viabilidad celular significativamente menor respecto de las muestras irradiadas con fotones (54±2% vs 89,9±1,3%). Estos resultados evidencian un aumento radioinducido en la actividad de telomerasa en células hematopoyéticas y sugieren que la tasa de dosis y la calidad de la radiación pueden modificar la respuesta.

NEFROLOGIA IV

524. Actividad gelatinolítica de extractos proteicos de riñón de rata. Efecto del HgCl₂. Andrea Mendez, Ester Saball, Marcela Salvarrey y Mónica Elías.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. sabecar@arnet.com.ar

La remodelación del tejido conectivo es un proceso altamente organizado que involucra la acción selectiva de las metaloproteasas de la matriz. La fibronectina (Fn), componente de la matriz extracelular (ME), ha sido descrita como un potente sustrato proteolítico conteniendo actividades fibronectinasa y collagenasa/gelatinasa, pudiendo contribuir significativamente en ese proceso. Estas actividades son inhibibles por HgCl₂. En el presente trabajo se utilizó el modelo de insuficiencia renal aguda inducida por HgCl₂ en el cual previamente demostramos un aumento del depósito de Fn. Se estudiaron los extractos proteicos de riñones de ratas control y tratadas 1 y 5 hs después de una única dosis de HgCl₂ (5mg/kg peso, s.c.). Los mismos se analizaron por Western blot (identificación de Fn) y zimo-grafía (actividad gelatinolítica), consistente esta última, en una electroforesis en gel de poli(acrilamida) copolimerizado con gelatina en presencia de SDS. Los extractos de riñón 1 h mostraron una notoria inhibición de la actividad gelatinolítica con intensificación de la banda proteica correspondiente a Fn. Por el contrario, los extractos 5 hs no presentaron diferencias con los controles. Estos resultados sugieren que el HgCl₂ a través de la inhibición de la actividad autoproteolítica y gelatinolítica de la Fn jugaría un rol importante en las alteraciones de la ME en este modelo experimental animal.

525. **Depuración de aniones orgánicos en ratas con calcosis arterial sostenida.** Nora Quaglia, Anabel Brandoni, Alejandro Ferri *y Adriana Torres.

Farmacología. Departamento de Ciencias Fisiológicas. CONICET. (*) Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Email: adtorres@fbioyf.unr.edu.ar

Se han evidenciado variaciones en la farmacocinética de aniones orgánicos en ratas con calcosis arterial en estadio inicial. El objetivo de este trabajo fue evaluar la depuración de Sulfanilamida (SA, anión orgánico modelo, que se elimina preferentemente por vía renal), en ratas Wistar macho con calcosis arterial sostenida. Se trabajó con un grupo control (C, n=10) y con ratas estudiadas 10 días después de una dosis de Vitamina D3 (300000 UI/kg p.c., i.m.; T, n = 7). Se determinaron Uremia (U), Calcemia (Cap), Calcio en tejido aórtico (Caa), Flujo Sanguíneo Renal (FSR) y parámetros farmacocinéticos de SA (0.4 mg/kg p.c.; i.v.). Resultados (* P < 0.05): U (g/l): C=0.45 ± 0.03, T= 0.34 ± 0.01; Cap (mg%): C= 9.26 ± 0.16; T= 7.64 ± 0.48, Caa (umol/g tej seco): C=24 ± 2; T=50 ± 5*; FSR (ml/min/100 g, p.c.): C=5.32 ± 0.75, T = 1.58 ± 0.39*, Clearance sistémico (ml/min/100g. p.c.): C=2.66 ± 0.17, T=3.14 ± 0.09*, K1-0 (constante de velocidad de eliminación; min⁻¹): C=0.15 ± 0.01; T=0.116 ± 0.005*, Volumen de distribución Central (ml/100g.p.c.): C=18.41 ± 0.66, T=27.03 ± 1.02*, Volumen de Distribución Periférico (ml/100g.p.c.): C=25.76 ± 1.14, T=18.21 ± 0.73*. Las ratas tratadas presentan una disminución de K1-0 ocasionada probablemente por la variación de FSR. El aumento en el Clearance sistémico de SA podría explicarse por la reacomodación de los volúmenes de distribución.

526. Diferencia ligada al sexo en el flujo sanguíneo renal y en la secreción tubular de paraaminohipurato (PAH) en ratas. Jorgelina Cerrutti (*), Nora Quaglia y Adriana Torres.

Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. CONICET. (*) Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. e-mail: adtorres@fbioyf.unr.edu.ar

Trabajos anteriores indicaron que existe diferencia ligada al sexo en la depuración renal de PAH. Los machos presentaron una mayor carga filtrada y secretada del anión. El objetivo de este trabajo fue evaluar si variaciones en el flujo sanguíneo renal y/o en el transporte transepitelial renal de PAH justifican esta diferencia. Se determinó el flujo sanguíneo renal (FSR) mediante el empleo de microesferas fluorescentes en ratas Wistar adultas, Machos (M) y Hembras (H). Se evaluaron los parámetros cinéticos de captación de PAH en vesículas de membrana apical (VMA, n = 3) y basolateral (VMB, n = 3), provenientes de corteza renal de M y H. La captación de ³H-PAH en VMA y en VMB se realizó utilizando la técnica de filtración rápida. Resultados: FSR (ml/min/100 g p.c.): M = 5.32 ± 0.75, n = 7; H = 2.72 ± 0.37, n = 7; P < 0.05. Parámetros cinéticos: **VMA**: Vmax (nmol/15 seg/mg Prot.): M = 214 ± 16, H = 229 ± 8; Km (mM): M = 4.92 ± 0.19, H = 7.80 ± 0.40; P < 0.05. **VMB**: Vmax (nmol/15 seg/mg Prot.): M = 54 ± 1, H = 28 ± 5; P < 0.05 y Km (mM): M = 4.65 ± 0.37, H = 1.08 ± 0.19,

$P < 0.05$. Conclusiones: El mayor FSR observado en machos justificaría, al menos en parte, la mayor carga filtrada y secretada de PAH. Las variaciones observadas en el transporte de PAH contribuirían a la mayor carga secretada del anión que presentan los machos.

527. Rol de la BSP/Bilirrubin Binding Protein (BBBP) en el transporte apical de aniones orgánicos en riñón de rata. Adriana Torres *, Myriam Mac Laughlin #, Wolfgang Stremmel †.

* Farmacología, Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. CONICET. # Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA. CONICET. † Medizinische Universitätsklinik, Heidelberg, Alemania. Email: adtorres@fbioyf.unr.edu.ar.

BBBP es una proteína involucrada en el transporte hepático de aniones orgánicos como bilirrubina y tetrabromosulfotaleína (BSP). Trabajos anteriores demostraron que BBBP se expresa también en membrana basolateral renal. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar si BBBP está presente en membrana apical (MA) renal y si interviene en el transporte de PAH. Se obtuvieron vesículas de MA ($n = 3$) a partir de corteza renal de ratas Wistar macho adultas. Estudios realizados: caracterización cinética del transporte de paraaminohipurato (^3H -PAH), análisis cinético del efecto inhibitorio de BSP sobre la captación de ^3H -PAH, detección de BBBP mediante Western Blot y efecto de anticuerpos anti-BBBP sobre la captación de ^3H -PAH. Resultados: Parámetros cinéticos de captación de PAH: $K_m = 4.8 \pm 0.3$ mM, $V_{max} = 212 \pm 17$ nmoles/mg Prot./15 seg. BSP ocasionó una inhibición de tipo competitivo con K_i igual a 0.58 ± 0.15 mM. Los estudios por Western Blot revelaron la presencia de BBBP en MA. Los anticuerpos antiBBBP (0.37 mg Ac./mg Prot.) inhibieron en un $52 \pm 2\%$ la captación de PAH ($P < 0.05$). Conclusión: La proteína BBBP está presente en membranas apicales de células de corteza renal y participaría, al menos en parte, en el transporte de PAH.

528. Respuesta vascular a noradrenalina (N) en riñones aislados de ratas diabéticas. Participación de receptores a angiotensina II (A) del subtipo AT_1 . Verónica García, Liliana Monasterolo, Mónica Elías.

Area Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. CONICET. e-mail:vgarcia@fbioyf.unr.edu.ar

Previamente, la vasculatura renal de ratas tratadas con aloxano (150 mg/kg, s.c.7 días antes del estudio) reveló menor dosis efectiva 50 (DE_{50}) de N y mayor respuesta a A. Prazosín (P) disminuyó la respuesta a A en riñones diabéticos. El objetivo es analizar la relación entre A y el sistema noradrenérgico en la respuesta vascular renal en este estadio de diabetes. En el modelo de riñón aislado y perfundido, se agregaron dosis crecientes de N y se registraron variaciones de presión bajo flujo constante. Se midió esta respuesta en presencia y ausencia de losartán (L) 1 μ M, en riñones controles (C) y diabéticos (D). Los D reafirmaron la menor DE_{50} (nmol) respecto a C (C: 7.8 ± 1.5 n:6; D: 3.4 ± 0.5 n:4, $p < 0.05$). L no modificó la respuesta a N de C, mientras que la curva de D reveló aumento significativo de la DE_{50} (D_{+L} : 5.5 ± 1.7 n:5, $p < 0.05$ vs D), sin cambio en la respuesta máxima. La mayor DE_{50} con L en D, indica participación de receptores AT_1 en la respuesta a N. Los resultados indican que en C la respuesta a A no cambia por el agregado de P ni la respuesta a N se modifica por L, mientras que en D la respuesta a A y a N es sensible a P y L respectivamente. Así, en este estadio de diabetes, la vasculatura renal, que posee mayor capacidad de respuesta a ambos vasoconstrictores, manifiesta una interrelación entre dichas respuestas de manera que receptores alfa $_1$ contribu-

yen a la respuesta a A y receptores AT_1 contribuyen a la respuesta a N.

529. Efecto de la insulina sobre la captación de DOPA por el túbulo contorneado proximal. Andrea Carranza, Pablo Damiano, Marta Barontini, Susana Nowicki.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R.Gutierrez. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA. adrenalina@cedie.guti.gov.ar

Resultados previos indican que la excreción renal de DOPA en ratas diabéticas (diabetes tipo I por estreptozotocina) es mayor respecto del grupo control. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1- analizar *in vivo* la excreción renal de DOPA y dopamina (DA) en un modelo de diabetes de tipo II (modelo de fructosa) que presenta hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, y 2- estudiar *in vitro* el efecto de la insulina sobre la captación de DOPA por células del túbulo proximal (TP). 1- Luego de 4 semanas de tratamiento (fructosa al 10% en el agua de bebida) se recogió orina de 24h en jaulas metabólicas. Se observó, con respecto del grupo control, una reducción de la excreción renal de DA (en pg/24h 6314 ± 342 vs 4837 ± 369 , $p < 0.05$) y del aporte de DOPA al TP (CI Creat x LD en plasma) (en pg/min 402 ± 76 vs 108 ± 23 , $p < 0.05$) sin cambios en la excreción de DOPA (en pg/24h 1438 ± 161 vs 1631 ± 296 , N.S.), sugiriendo una menor reabsorción de DOPA por el TP. Las diferencias no se observaron luego de 22 semanas de tratamiento. 2- La insulina (10-100 uU/ml) aumentó la captación de DOPA por células aisladas del TP de forma dosis dependiente, con un máximo de hasta el 300%. Los resultados sugieren que la insulina facilita la captación de DOPA por el túbulo proximal, y que ésta se encuentra alterada cuando la acción de la insulina se ve impedida.

530. Origen embrionario y lineaje de la vasculatura renal. María Sequeira López, Ellen Pentz y Ariel Gómez.

Departamento de Pediatría, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA, USA. e-mail: msl7u@hscmail.mcc.virginia.edu

El origen embrionario y el lineaje de las células de la vasculatura renal es desconocido. Para determinar el lineaje, células de riñones de rata embrionarios de 14 días de gestación (E14) fueron micropipeteadas y sometidas a RT-PCR para renina y para marcadores de músculo liso, endotelio y mesénquima. Se encontraron progenitores de todas las células mencionadas previo al desarrollo vascular, pero en este estadio, las células yuxtglomerulares no expresan aún marcadores endoteliales o de músculo liso. Doble y triple marcado con marcadores de lineaje a edades embrionarias más tardías y a edades postnatales (P) (E14-P70) reveló que a E16, cuando el vaso se está ensamblando, las células de renina adquieren la capacidad de expresar músculo liso, sugiriendo que las células de renina pueden dar origen a músculo liso arteriolar renal. Para determinar si estas células vasculares se originan dentro del riñón metanéfrico o invaden al mismo, trasplantes de riñones embrionarios prevasculares debajo de la cápsula renal de ratones transgénicos demostraron que todas las células de las arteriolas renales se originan in situ a partir de células metanéfricas mesenquimáticas. Además de dar origen a la célula yuxtglomerular, la célula progenitora de renina, contrariamente a lo pensado, no deriva de la célula muscular sino que da origen a la célula muscular lisa de la arteriola renal.

531. Aspectos funcionales y morfológicos en riñón de rata Obesa (Zucker fa/fa.) Jorge Toblli, Graciela De Rosa, Gabriel Cao, Pablo Piorno.

Laboratorio de Medicina Experimental Hospital Alemán & Departamento de Patología Hospital de Clínicas.

La obesidad mórbida se asocia con deterioro de la función renal por múltiples factores. Nuestro objetivo fue valorar y correlacionar aspectos morfológicos y funcionales en riñón de ratas obesas Zucker (ZRF) y controles no obesos Zucker (ZRL). Ratas machos (de 6 semanas), G1=ZRF y G2=ZRL. Luego de 10 meses se evaluó: a) Clearance de creatinina (Cl.cr.) y b) proteinuria (Up). En tejido renal mediante ocular con grilla, retículo y fórmulas establecidas se valoró: a) Volumen glomerular (VG); b) Esclerosis glomerular (EG) y c) % Fibrosis intersticial (FI). Se aplicó test de Mann-Whitney con alfa = 0.05, y regresión múltiple (RM) en el G1, utilizando como variable dependiente el Cl.cr. e independientes: a) VG; b) EG; c) FI.

Media ± DS	G1 ZRF (n=12)	G2 ZRL (n=12)	p
Peso Corporal (g)	658.7 ± 101.4	355.5 ± 34.1	< 0.01
Cl.cr. (ml/min)	1.22 ± 0.47	1.67 ± 0.40	< 0.02
Up (mg/día)	63.3 ± 18.6	3.5 ± 2.5	< 0.01
VG (10 ⁶ u ³)	1.28 ± 0.26	0.54 ± 0.06	< 0.01
EG (Score)	56.6 ± 32.8	1.4 ± 0.4	< 0.01
FI (%)	4.37 ± 1.30	0.77 ± 0.25	< 0.01

El G1 ZRF presentó mayor Up; VG; EG y FI vs. G2 ZRL. La RM demostró que el VG fue la variable más significativa en la variación del Cl.cr. (p= 0.03; r= 0.73) en ZRF. Estos resultados muestran aspectos del daño renal en este modelo de obesidad.