

RESUMENES DE LAS COMUNICACIONES

COMUNICACIONES ORALES

ENDOCRINOLOGÍA I

- Aumento de la síntesis de proteína desacoplante-1 en grasa parda de ratas hipotiroideas adaptadas al frío.** Angel Zaninovich(1), Marcela Raices(1), Inés Rebagliati(1), Paula Coluccio(1), Conrado Ricci(1).

(1)Conicet, Lab. de Investigaciones Tiroideas, Htal. de Clínicas, Buenos Aires
 azaninovich@sinectis.com.ar

Las hormonas tiroideas son esenciales para iniciar la respuesta termogénica de grasa parda (GP) al frío, pero su rol en el mantenimiento de la termogénesis durante el frío prolongado no es conocido. Este trabajo estudió los cambios en GP de ratas hipotiroideas aclimatadas al frío. Ratas normales Wistar fueron colocadas a 4°C. Dos meses después se indujo el hipotiroidismo con 131 I y metimazol y las ratas continuaron en el frío por dos meses más. Luego de 4 meses a 4°C, la T4 y T3 séricas descendieron a niveles no detectables, la temperatura corporal (37.8±0.2°C) y la sobrevivencia fueron normales. Se extrajo GP interscapular y se midió la proteína desacoplante-1 (UCP1) y el consumo de oxígeno mitocondrial (cO2). Los valores mitocondriales promedio ±S.D. de ratas normales e hipotiroideas aclimatadas al frío fueron, respectivamente: proteínas 18.1±0.6 (n=16) y 22.2±0.8 (n=31) mg/ml (P<0.01); cO2 416±26 (n=16) y 396±16 (n=31) ng atoms O2/min/mg prot; western blot analysis empleando anticuerpos anti-UCP1 específicos mostró en GP normal e hipotiroidea (n=6 por grupo) un aumento de UCP1 (unidades OD) de cinco veces sobre niveles en ratas a 24°C. El tratamiento con T4 no alteró el valor de cO2, pero la simpatectomía lo disminuyó 40%. La reserpina indujo igual descenso en GP y músculo esquelético. Conclusión: La síntesis de UCP1 y la termogénesis durante el frío crónico son regulados principalmente por el simpático.

- Reversión de la hiperglucemia luego del trasplante alógeno de islotes pancreáticos murinos tratados con O-sialoglicoproteína endopeptidasa en ratones diabéticos.** Mercedes Vieiro(1), Candela Ceballos(1), Sung Ho Hyon(1), Eugenia Álvarez(1), Pablo Argibay(1).

(1)Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental-Hospital Italiano de Buenos Aires
 mailto:mmvl@hitalba.edu.ar

Introducción: A pesar de la inmunosupresión el trasplante de islotes pancreáticos tiene baja efectividad debido básicamente a fenómenos inmunológicos específicos e inespecíficos. Las glicoproteínas O-glicosiladas, tales como las mucinas, desempeñan un rol fundamental en fenómenos inflamatorios interviniendo como ligandos específicos en la interacción leucocito-célula blanco. La delección de las mismas podría tener un efecto inmunomodulador resultando en una mejor funcionalidad. Métodos: La evaluación de islotes tratados con una O-sialoglicoproteína endopeptidasa (OSEP) purificada de *Pasteurella haemolytica* se realizó en términos de normoglucemia postrasplante. En ratones C3H diabetizados con estreptozotocina (270 mg/kg) se implanta-

ron 200 islotes de ratones C57BL/6. Se definieron 4 grupos: A) n=5, OSEP (0,12 mg/kg por 30 min a 37°C) + ciclosporina A (CsA, 20 mg/kg s.c.); B) n=9, OSEP sin CsA; C) n=6, CsA; D) n=9, sin tratamiento. Se determinaron glucemias diarias y se consideró reversión de la diabetes a glucemias <250 mg/dl. Resultados: (en términos de reversión inicial) grupo A, 60% (rango 3 a 7 días); grupo B, 0% (p=0, vs. grupoA; Wilcoxon Mann-Whitney U-test); grupo C, 20% (p<0,05); grupo D, 11% (p<0,05). No hubo diferencias significativas entre los grupos B, C y D. Conclusión: El tratamiento de los islotes con O-sialoglicoproteína endopeptidasa asociado a inmunosupresión con CsA podría tener un efecto protector sobre la funcionalidad inicial del injerto.

- Los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y fibroblástico básico (bFGF) regulan la incorporación de glucosa y la actividad de LDH en células de Sertoli (CS) por una vía PI3K-pkB dependiente.** María F. Riera(1), Silvina B. Meroni(1), Eliana H. Pellizzari(1), Helena F. Schteingart(1), Selva B. Cigorraga(1).

(1)Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños R. Gutiérrez. Buenos Aires. Argentina.
 sertoli@cedie.org.ar

La regulación de la producción de lactato en CS por FSH, factores de crecimiento y citoquinas es producida por modificaciones en los niveles de incorporación de glucosa a la célula y en la actividad de LDH. El objetivo de este trabajo fue determinar si la vía dependiente de fosfatidilinositol-3-kinasa y proteína quinasa B (PI3K-pkB) participa en la regulación por EGF y bFGF de estos procesos en CS. Se utilizaron cultivos provenientes de ratas de 20 días de edad que fueron estimulados con los correspondientes factores de crecimiento (30ng/ml) en ausencia o presencia de un inhibidor de PI3K (wortmanina, W: 0.01, 0.1 y 1 microM). Se observó que W inhibe en forma dosis dependiente la incorporación de 2-deoxiglucosa estimulada por EGF y bFGF (EGF: 939±72, EGF+W0.01: 793±138, EGF+W0.1: 512±47*, EGF+W1: 272±12*, bFGF: 865±42, bFGF+W0.01: 660±57*, bFGF+W0.1: 514±36*, bFGF+W1 525±69* dpm/microg DNA, media±DS, n=3, *p<0.01). W también inhibe la estimulación de la actividad de LDH producida por EGF y bFGF (bFGF:51.6±7.5, bFGF+W1: 37.5±0.2*, EGF: 49,9±5,2, EGF+W1: 38,8±3.7*, mUI/microg DNA). Finalmente, el análisis por Western blot de pkB fosforilada demostró un aumento de la misma luego de la incubación de células de Sertoli (30 a 90 minutos) con ambos factores de crecimiento. Los resultados obtenidos demuestran la participación de PI3K-pkB en el mecanismo de acción utilizado por EGF y bFGF en la regulación de la entrada de glucosa y de la actividad de LDH en células de Sertoli.

- Diferencias entre ensayos en la medición de hormona de crecimiento (GH) sérica. Importancia en el diagnóstico de la deficiencia de gh en la infancia.** Eduardo A. Chalder(1), Alicia Belgorosky(1), Mercedes Maceiras(1), Mariano Mendioroz(1), Marco A. Rivarola(1).

(1)Hospital de Pediatría Prof. Dr. «Juan P. Garrahan»

El diagnóstico de insuficiencia de GH se basa en el uso de test provocativos de la secreción de GH. Algunos reportes proponen 10 ng/ml como valor de cutoff. Los inmunoensayos muestran

discrepancias debidas a diferentes calibradores, heterogeneidad de las formas circulantes de GH, interferencia de la proteina transportadora de GH y los epitopes reconocidos por los anticuerpos usados. Nosotros analizamos los valores de cutoff usando diferentes inmunoensayos comerciales, definiendo el valor de 10 ng/ml para el ensayo SER 66/217. La forma 22kDa fue evaluada con DELFIA 80/505. Se usaron 80 suero de 42 individuos (26 varones y 16 mujeres entre 3.2 y 16 años). Los metodos comparados fueron: SER 66/217, SER 80/505, SER 88/624 (Bio Chem Immuno System); IMM 80/505 (Immunotech); DELFIA 80/505 (Wallac Oy); DSL 80/505, DSL 88/624 (Diagnostic System Laboratories); DPC Q 80/505, DPC RIA 66/217 (Diagnostic Product Corporation) y NI 80/505 (Nichols Institute). Por analisis de Ratio plot se obtuvieron los siguientes coeficientes de conversión a DELFIA 80/505: SER 66/217:0.48; SER 80/505:0.51; SER 88/624:1.07; IMM 80/505:0.98; DSL 80/505:1.31; DPC Q 80/505:0.76; NI 80/505:0.74; DPC RIA 66/217:0.67 y DSL 88/624:1.87. Estas diferencias se confirman por analisis de regresión lineal y graficos de Bland y Altman. Se concluye que el cutoff diagnostico de insuficiencia de GH debe ser establecido segun el método utilizado.

5. Relación entre el eje GH-IGF-1, sensibilidad a la insulina (SI) y androgenos adrenales (AA) en mujeres (M) y varones (V) prepuberes (PP) y durante el desarrollo puberal (PU). Gabriela Guercio(1), Eduardo A. Chaler(1), Mercedes Maceiras(1), Marco A. Rivarola(1), Alicia Belgorosky(1).

(1)Hospital de Pediatria Garrahan

Hemos analizado una posible implicancia del eje GH-IGF-1 y de la SI en la regulacion de AA en M y V Pp y Pu. Se analizaron 3 grupos (Gr): Gr1 (Pp) 33 V, 33 M; Gr2 Pp tardio y Pu temprano 30 V, 26 M y Gr3 (Pu) 23 V, 28 M. Se evaluaron los niveles sericos de dehidroepiandrosterona sulfato (SDHEA), androstenediona (A), IGF-1 y SI estimada mediante la relacion en ayunas Glucemia/Insulina (G/I). G/I fue significativamente mas alto en VGr1 (35.9±19.7) que en MGr1 (25.8±12.2), p=0.018 y en VGr2 (26.6±21.3) que en MGr2 (16.9±5.82), p=0.03, pero fue similar en VGr3 y MGr3. Se hallo una correl. negativa sig. entre edad y G/I en MGr1, MGr2, MGr3 y solo en VGr2. SDHEA fue similar en M y V en los 3 Gr. A fue sig. mas alta en MGr3 (1.3±0.7) que en VGr3 (0.86±0.51), p=0.02. Se hallo una correl. neg. sig. entre G/I e IGF-1 en Gr1 y Gr2 de ambos sexos. Se encontro una correl. neg. sig. entre G/I y SDHEA eb MGr1, MGr2 y en V solo en Gr2. Solo en MGr1 se hallo una correl. positiva sig. entre IGF-1 y SDHEA. Analisis de Pearson mostro resultados similares. Nuestros datos apoyan que habria un dimorfismo sexual en el mecanismo de la adrenerca (Adr) humana. El eje GH-IGF-1 en las niñas Pp podria inducir insulinoresistencia (IR) y participar en la Adr. Sin embargo en M y V Pu, la SI podria estar involucrada en la modulacion de los AA particularmente en la Pu temprana. La activacion mas temprana del eje GH-IGF-1 en M podria ser un factor clave en el comienzo mas temprano de la Pu.

6. Relación densitométrica músculo/hueso en obesas hiperinsulinémicas. María R. Ulla(1), M Stivala(1), Roberto Noriega(1), Gustavo R. Cointry(2), José L. Ferretti(2).

(1)Centro de Estudios de Osteopatías Médicas, Córdoba,
(2)Centro de Estudios de Metabolismo Fosfocálcico, UNR, Rosario.
jferretti@arnet.com.ar

Analizamos las relaciones entre las masas densitométricas (DEXA) mineral, magra y grasa (MM, LM, FM) del cuerpo entero en 58 mujeres euglicémicas pre- y post-menopáusicas, con hiperinsulinemia y distribución típica de la grasa abdominal, clasificadas según su insulinemia basal (IB) superara (I) o no (II) las 15 uU/ml. La IB correlacionó positivamente con la LM y la FM, pero no con la MM. El cociente MM/LM decreció con la IB. Las correlaciones entre MM y LM fueron lineales y paralelas a la de 400 controles etarias normales, pero mostraron mayor ordenada al origen para el grupo II que para el I (ANCOVA, p<0.001). Ajustando

la MM a un valor común de 18 kg de FM, las curvas mantuvieron su paralelismo, y el grupo I mostró menor ordenada al origen que los controles. Ni la menopausia ni la magnitud de la respuesta de la IB a la glucosa interactuaron con esos efectos. A pesar de no afectar significativamente la glicemia en estos pacientes, la alta IB habría aumentado su peso, su LM y su FM. Además, asumiendo que la LM refleja la musculatura, también habría incrementado exageradamente su masa muscular respecto de su masa ósea. Si así fuera, el exceso de insulina habría reducido la influencia biomecánica de los músculos sobre el esqueleto. Esto evidenciaría en forma original un desplazando del punto de referencia (la deformación ósea

7. Daño pancreático por estreptozotocina: efecto modulador de 15-deoxi-delta 12,14 Prostaglandina J2 en la producción de óxido nítrico y prostaglandinas. Elida Gonzalez(1), Alicia Jawerbaum(1), Débora Sinner(1), Carolina Pustovrh(1), Verónica White(1), Evangelina Capobianco(1), Carmen Xaus(2), Carmen Peralta(2), Joan Roselló-Catafau(2).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. Buenos Aires (2)Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona. España.
elidate@arnet.com.ar

15-deoxy-delta 12,14PGJ2 (15d-PGJ2) es ligando natural de PPARgamma. Su activación inhibe la expresión de iNOS y COX2, que a su vez producen el incremento de agentes inflamatorios en islotes diabéticos. Nuestra hipótesis es que 15d-PGJ2 regularía la respuesta inflamatoria del páncreas diabético. Se evalúa la actividad de NOS Ca2+dependiente (cNOS) e independiente (iNOS) (pmol NO.min.mg prot-1) y los niveles de nitritos (N) (nmol.mg prot-1), 15-dPGJ2 (pg.mg prot-1) y PGE2 (pg.mg prot-1) en islotes pancreáticos aislados de ratas sanas (C) y diabéticas por estreptozotocina (D). Nuestros resultados muestran que 15d-PGJ2 es menor en islotes D (0.22±0.07) que en C (0.50±0.04) (p<0.05). La actividad de cNOS (C: 1.6±0.04, D: 1.63±0.05) e iNOS (C: 0.5±0.03, D: 1.4±0.02) es inhibida por 15d-PGJ2 10-5M, tanto en C (CcNOS 1.2±0.02, CiNOS 0.2±0.01, p<0.05) como en D (DcNOS 1±0.02, DiNOS 0.51±0.03, (p<0.001). La actividad de iNOS se encuentra incrementada en islotes D con respecto a C (p<0.01). Los niveles de N y PGE2, mayores en D (0.56±0.05 y 6.30±0.6) que en C (0.28±0.03 y 2.58±0.5) (p<0.05 y p<0.001 respectivamente), disminuyen en presencia de 15d-PGJ2 (NC 0.11±0.04, ND: 0.26±0.04, p<0.05, PGE2C: 0.51±0.04, PGE2D: 3.0±0.05), p<0.05). Nuestras observaciones sugieren que 15d-PGJ2 es capaz de modular los niveles de agentes proinflamatorios en islotes pancreáticos, y que su disminución en islotes diabéticos está probablemente relacionada con la perpetuación del daño inflamatorio.

8. Caracterización una línea celular osteoblástica (CC3) obtenida a partir de un cultivo primario de calota craneana fetal de rata. Elías Mongiardini(1), Miguel Reigosa(1), Andrés Zambelli(1).

(1)Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), La Plata
imbice@netverk.com.ar

La diferenciación de osteoblastos es relevante tanto en el desarrollo óseo como en algunas patologías óseas, siendo mucho lo que resta por conocer, sobre todo acerca de los controles y señales involucradas. La hormona PTH interviene en este proceso disparando la expresión de varios genes involucrados. Con el objeto investigar la participación de PTH en la diferenciación osteoblástica, hemos desarrollado un cultivo primario de osteoblastos aislados de calota craneana de fetos de rata de 21 días. Las células se disociaron por digestiones secuenciales de 20, 40 y 90 min con colagenasa/tripsina. Las células provenientes de la última digestión fueron cultivadas en D-MEM/10% SFB. La diferenciación osteoblástica se indujo por el agregado de áci-

do ascórbico y glicerofosfato durante 7 días. Para la caracterización de CC3 se investigó la expresión del receptor de PTH, tanto a nivel de la transcripción como la búsqueda por inmunohistoquímica de la proteína, siendo en ambos casos positiva. Se midió la actividad de fosfatasa alcalina (característica de osteoblastos) siendo de 47 ± 3 nmol/min.mg proteína. Se evaluó el efecto de PTH(1-34) 10⁻⁷ M sobre la transcripción del factor de transcripción XBP-1, observándose un incremento de 1,5 veces ($p < 0.05$) luego de 3,5 horas de tratamiento, resultado similar al obtenido en la línea osteoblástica establecida MC3T3-E1. Estos datos muestran que la línea CC3 es un adecuado modelo para estudios sobre el efecto de PTH en la diferenciación osteoblástica.

HEMATOLOGÍA I

9. Expresión de moléculas de adhesión endoteliales mediada por Lopap. Ana M. Chudzinski-Tavassi(1), Mirta A. Schattner(2), Roberto G. Pozner(2), Cleyson V. Reis(1), Lina P. D'Atri(3), Sara A. Litwak(3), María A. Lazzari(2).

(1)Laboratorio de Bioquímica - Instituto Butantan - Brasil.
(2)Instituto de Investigaciones Hematológicas - Academia Nacional de Medicina, CONICET (3)Instituto de Investigaciones Hematológicas - Academia Nacional de Medicina
mailto:amchudzinski@hotmail.com

El veneno de *Lonomia obliqua* produce una severa coagulopatía de consumo que puede conducir a un síndrome hemorrágico. Lopap (Lo), es una serino-proteasa de 69 kDa activadora de Protrombina purificada de *L. obliqua*. In vivo, Lo induce formación de trombos y secuestro de neutrófilos en la microvasculatura pulmonar de rata, depleción de fibrinógeno y 30% reducción de plaquetas. En este estudio se analizó el efecto de Lo sobre células endoteliales (CE) de cordón umbilical humano. El análisis por citometría de flujo mostró que la incubación de Lo (5 ug/ml) por 1 h produjo un aumento en la expresión de ICAM-1 (7 ± 1 vs 19 ± 3 unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF), $p < 0.05$, $n=7$) y E-Selectina (4 ± 1 vs 24 ± 5 UAF, $p < 0.05$, $n=3$) sin modificar los niveles de VCAM-1 (3 ± 1 vs 4 ± 1 UAF, n/s , $n=6$). El incremento en la expresión de E-selectina fue específico ya que el pretratamiento de las CE con un suero contra *L. obliqua* inhibió casi completamente los niveles aumentados de E-selectina. Tampoco estuvo asociado a la formación de trombina dado que la hirudina no modificó el aumento de ICAM-1. Lopap no fue capaz de inducir liberación o síntesis del factor von Willebrand valorada por ELISA ($n=5$). La acción directa de Lo sobre CE podría tener un rol importante en la patogénesis de los desórdenes inflamatorios y de coagulación observados durante la infusión de Lo en ratas o en el contacto accidental con *L. obliqua* en humanos.

10. Activación de células endoteliales por Berythrom. Ana M. Chudzinski-Tavassi(1), Mirta A. Schattner(2), Lina P. D'Atri(3), Márcia Bezerra da Silva(1), Roberto G. Pozner(2), Sara A. Litwak(3), María A. Lazzari(2).

(1)Laboratorio de Bioquímica - Instituto Butantan - Brasil.
(2)Instituto de Investigaciones Hematológicas - Academia Nacional de Medicina, CONICET (3)Instituto de Investigaciones Hematológicas - Academia Nacional de Medicina
mailto:amchudzinski@hotmail.com

Las serpientes *Bothrops erythromelas* están distribuidas en el Nordeste de Brasil. Esta especie es particularmente interesante ya que su veneno presenta actividad procoagulante más potente que otras especies de este género. Berythrom (Be) es una metaloproteasa de 78 kD purificada de *B. erythromelas* y su estructura primaria fue deducida a partir del cDNA. In vitro Be mostró ser activador de protrombina. Evaluamos el efecto de Be sobre células endoteliales (CE) de cordón umbilical humano. La incubación de Be (5ug/ml) por 1 h produjo alteraciones morfológicas de las CE. El análisis por citometría de flujo mostró además, un aumento en la expresión de ICAM-1 ($C 12 \pm 1$ vs Be

21 ± 3 unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF), $p < 0.05$, $n=6$) y E-selectina ($C 7 \pm 1$ vs Be 25 ± 1 UAF, $p < 0.05$, $n=4$) sin modificar los niveles de VCAM-1 ($C 4 \pm 1$ vs Be 4 ± 0.5 UAF, n/s , $n=4$). Be indujo un aumento de 153% ($p < 0.05$, $n=4$) en la liberación de Factor von Willebrand (FvW) (ELISA). La secreción de FvW fue bloqueada por suero anti Botrópico pero no por el pretratamiento con hirudina indicando una acción directa de Be sobre el endotelio. El bloqueo del sitio activo de Be por un péptido dirigido contra el sitio específico de metaloproteasas tampoco suprimió la liberación de FvW mientras que el mismo fragmento inhibe la activación de protrombina. En conclusión Be es una metaloproteasa que modula respuestas de activación endotelial aparentemente a través de un dominio distinto al que utiliza como activador de protrombina.

11. Producción de Factor von Willebrand en megacariocitos. Roberto G. Pozner(1), Lina P. D'Atri(2), Inés Engelberger(2), María A. Lazzari(1), Ricardo M. Gómez(3), Patricio Salonia Ruza(4), Mirta A. Schattner(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas - Academia Nacional de Medicina, CONICET (2)Instituto de Investigaciones Hematológicas - Academia Nacional de Medicina (3)Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA, CONICET (4)Servicio de Ortopedia y Traumatología - Hospital Militar Central Dr. Cosme Argerich
mailto:rpozner@hematologia.anm.edu.ar

Los megacariocitos (Mks) sintetizan Factor von Willebrand (FvW) y lo depositan en gránulos alfa. Evaluamos la producción constitutiva de FvW o la liberación aguda en respuesta a agonistas procoagulantes o proinflamatorios. Los Mks se obtuvieron por expansión in vitro de células CD34(+) de médula ósea humana estimuladas con trombopoyetina (10ng/ml). El FvW fue determinado en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Se observó producción constitutiva de FvW a los 12 días de cultivo (659 ± 174 ng/ml). El tratamiento de los cultivos con prostaciclina (0.1ug/ml) o un dador de óxido nítrico (DETA-nonoato) (12uM) disminuyó la liberación de FvW respecto del control (498 ± 146 , 529 ± 148 ng/ml respectivamente, $p < 0.05$, $n=4$). Ambas drogas no mostraron efectos aditivos (522 ± 137 ng/ml, $n=4$). La disminución en la producción de FvW no estuvo asociada a una disminución en el número de Mks ($n=4$). Mks maduros estimulados 30 min. con trombina 0, 0.05, 0.2 y 1U/ml liberaron 16 ± 0.1 , 17 ± 0.3 , 19 ± 2 ($p=0.049$) y 23 ± 2 ng/ml ($p=0.036$) respectivamente ($n=3$). La estimulación por ADP (10uM) produjo 22 ± 1.4 ng/ml ($p=0.02$), mientras que el TNF (0.1 y 10ng/ml) no provocó diferencias significativas (18 ± 0.2 ng/ml, $n=3$). Los resultados muestran que los Mks son capaces de producir FvW de manera constitutiva y liberar el contenido intracelular por agonistas procoagulantes. Los nucleótidos cíclicos estarían involucrados en la regulación de la generación constitutiva de vW.

12. Síntesis y liberación endotelial de Factor von Willebrand inducida por factor de necrosis tumoral-alfa. Roberto G. Pozner(1), Lina P. D'Atri(2), María A. Lazzari(1), Sara A. Litwak(2), Natalia Bettini(2), Norma Maugeri(1), Mirta A. Schattner(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas - Academia Nacional de Medicina, CONICET (2)Instituto de Investigaciones Hematológicas - Academia Nacional de Medicina
mailto:rpozner@hematologia.anm.edu.ar

El Factor von Willebrand (FvW) es una proteína que transporta al Factor VIII y permite la unión de plaquetas al subendotelio. Es sintetizada por células endoteliales (CE) y megacariocitos. El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF) promueve respuestas funcionales del endotelio vascular. Su rol en la liberación de FvW es poco conocido. En este estudio evaluamos el rol del TNF en la síntesis y secreción del FvW. Se utilizaron CE de cordón umbilical humano. El FvW se cuantificó en sobrenadantes o lisados celulares por ELISA. La estimulación de CE durante 30-60 min. con TNF (1-500 ng/ml) no produjo secreción de FvW. El TNF tam-

co modificó la liberación de FvW inducida por trombina (TR) (C 16±4 TR 24±5, TR+TNF 22±5ng/ml, n=5). Sin embargo, la incubación del endotelio con TNF durante 4 hs. aumentó la liberación de FvW (125, 131, 137% del Control para 1, 5 y 10ng/ml respectivamente, n=6, p<.05). Este incremento de FvW fue revertido por la preincubación de CE con cicloheximida. El TNF no solamente aumentó la síntesis de novo del FvW sino que también potenció la liberación del contenido de FvW de los gránulos inducida por TR (C 10±1 TR 25±3, TR+TNF 43±1, p<.05, n=4). Este aumento no estuvo asociado a un mayor contenido intracelular de FvW (lisados C 593±134 vs. TNF 541±100ng/ml, n=8). Estos datos sugieren que el TNF facilitaría respuestas procoagulantes endoteliales.

13. Efecto de un bisfosfonato encapsulado en liposomas (LIP-CLOD) utilizado en la reversión de trombocitopenias inmunes, sobre la producción de megacariocitos (MK).

Fernanda Alves Rosa(1), Mónica Vermeulen(1), Juan Chiesa(1), Marina Narbaitz(1), Nico Van Rooijen(2), Marina S. Palermo(1), Martín A. Isturiz(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas. ANM (2)Facultad de Medicina. Vrije Universiteit. Amsterdam
mailto:ferar@ciudad.com.ar

Previamente demostramos que el bloqueo del sistema retículo endotelial utilizando LIP-CLOD revierte una trombocitopenia inmune (TI) severa en ratones de la cepa BALB/c. Este tratamiento involucra la eliminación específica de macrófagos (MØ) hepáticos y esplénicos, inhibiendo la captación de las plaquetas sensibilizadas. Este modelo murino es potencialmente importante para el estudio de tratamientos de púrpuras trombocitopénicas inmunes. Sin embargo, en determinadas circunstancias el LIP-CLOD induce trombocitopenia transitoria. Por ello, en este trabajo evaluamos los efectos del LIP-CLOD sobre la producción de MK en médula ósea (MO) y bazo (B) murinos. Con ese fin, se realizaron cultivos cortos de MK procedentes de células de MO y B estimuladas con trombopoietina, IL-3 e IL-11 (EST) en presencia de distintas concentraciones de LIP-CLOD. El número de MK obtenidos fue evaluado a través de citometría de flujo. Los resultados (MKx103 ± SEM) fueron: MO: control: 7.8±2.3; EST: 95 ±250*; EST+LIP-CLOD 60mg: 86.7±13.5*; 30mg 63 ± 7.7*, p< 0.01 vs control; ANOVA (n=4). En B: control 13.1±1; EST: 26.5±3; EST+LIP-CLOD 60mg: 62.4±3.1; 30mg: 70.6±4.5; *p<0.001, ANOVA. El análisis por inmunohistoquímica de B y M de ratones TI tratados con LIP-CLOD, permitieron corroborar los datos *in vitro*. Los resultados obtenidos indican que la eliminación de MØ en cultivos de MO y B a través de LIP-CLOD, no altera significativamente la producción de las células precursoras plaquetarias, los MK.

14. Interferencia del inhibidor lupico (IL) sobre el método bethesda de titulación de anticuerpos anti-factor VIII (a-fVIII). Andrea A. Peirano(1), Alicia N. Blanco(2), Silvia H. Grosso(2), Laura C. Gennari(2), María A. Lazzari(2).

(1)Academia Nacional de Ciencias (2)Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina
blanco@hematologia.anm.edu.ar

Dada la coexistencia de a-fVIII e IL, nos propusimos evaluar su posible interferencia sobre la titulación de a-fVIII. Aplicamos el método Bethesda (MB) (determinación de factor VIII en una etapa, que puede ser afectada por la presencia de IL) y lo comparamos con el método de titulación por sustrato cromogénico (SC) (determinación no afectada por el IL). Evaluamos muestras de IL (según criterios del SSC-ISTH) con APTT (PTTLA, Stago) muy prolongados (relación Paciente/Normal > 2). Los resultados de las pruebas para IL fueron: APTT (84-213 seg), APTTIndiceRosner (0,81-0,78), APTTPNP (11-30 seg), dRVVTP/N (1,78-2,57), dRVTTIndiceRosner (0,30-0,49) y dRVTTPNP (0,10-0,78). Para la titulación de a-fVIII por SC se procedió de manera análoga al MB, incubando las mezclas (N+Dilución P) 2 h. a 37°C y determinando el fVIII residual por SC. El plasma del paciente que deja una actividad residual del 50%, se considera que con-

tiene 1 unidad (USC)/ml. El título a-fVIII por SC fue nulo o insignificante (0,00-0,06 USC/ml). En cambio, títulos bajos a moderados, fueron obtenidos por MB: 0,75 UB/ml en un paciente y en los 5 restantes, valores entre 1,00 y 7,00 UB/ml. Los resultados muestran que el IL puede afectar la titulación de a-fVIII por el MB, lo que implica la posibilidad de resultados falsos positivos, cuando se utilizan reactivos sensibles para el IL en la determinación de factor VIII. Este efecto no es observado en la titulación basada en la determinación de factor VIII por SC.

15. Niveles plasmáticos de Trombopoyetina y expresión en plaquetas de su receptor c-MPL en Trombocitopenias Hereditarias. Paula G. Heller(1), Ana C. Glembotsky(1), María S. Laguna(1), Rosana F. Marta(1), Felisa C. Molinas(1).

(1)Instituto de Investigaciones Médicas A.Lanari
mailto:gchantada@intramed.net.ar

Las Trombocitopenias Hereditarias (TH) comprenden entidades relacionadas a defectos en la megacariocitopoyesis. La Trombopoyetina (Tpo) estimula el crecimiento de megacariocitos y potencia la agregación plaquetaria a través de su unión al receptor c-MPL. Se investigó el rol de la Tpo y su receptor en la patogenia de las TH. Se evaluó agregación plaquetaria, IgG asociada a plaquetas, glicoproteínas de membrana, gránulos densos, IL-3,6,11 y Tpo plasmáticas (pg/ml), c-MPL en plaquetas con Ac antic-MPL por citometría de flujo (media de fluorescencia Ac/isotipo) y potenciación por Tpo de la agregación plaquetaria por ADP (Tpo+ADP/ADP). Se estudiaron 11 pacientes de 4 familias: trombocitopenia ligada al X (flia 1), macrotrombocitopenia autosómica dominante (flia 2), trombocitopenia autosómica dominante (flia 3 y 4).

Flia	Plaq #	Tpo	Ac/isotipo	Tpo+ADP /ADP
1.1	25	121	1.64	-
1.2	14	394	1.75	*
1.3	165	98	-	-
1.4	148	34	1.43	3.7
2.1	115	<31	1.46	2.43
2.1	76	<31	2.09	2.94
3.1	79	200	0.94	*
3.2	107	94	1	-
4.1	90	108	1.24	1.34
4.2	100	278	1.03	1.19
4.3	260	78	1.96	6.4
N	150-350	<78	1.4-2.2	>2

x 1000/ul *solo 1 ola

Se evidenció alteración en la agregación y disminución de gránulos densos en flia 3; aumento de IgG plaquetas y disminución de GpIX en flia.1, Tpo levemente aumentada en flia 1,3 y 4. IL-3,6,11 normales. La disminución del c-MPL y de la respuesta al Tpo en flias 3 y 4 podría estar relacionada a la patogenia de la trombocitopenia en estas entidades.

16. Agregación plaquetaria en trombocitemia esencial (TE): relación entre la respuesta a la adrenalina y al ADP. María S. Laguna(1), Paola R. Lev(1), Carlos J. Pirola(1), Felisa C. Molinas(1).

(1)Instituto de Inv.Médicas A Lanari
mailto:laguna@mail.retina.ar

La adrenalina y el ADP son agonistas débiles de la agregación plaquetaria. Sin embargo numerosos trabajos indicarían que en ausencia de ADP en el medio la adrenalina por si misma no induciría agregación. Anteriormente en 20 pacientes (P) con TE encontramos asociación entre los defectos en la respuesta a estos dos agonistas. Sin embargo esta asociación era parcial ya que se observaron P con una respuesta alterada a la adrenalina (ausencia de respuesta o disminución de la 1ª ola) y normal para el ADP. Para profundizar en el estudio de esta relación se determi-

nó en 10 de estos 20 P la agregación inducida por concentraciones subumbrales de ADP (0.2 y 0.8 μ M) y se determinó en 3 P sin respuesta a la adrenalina el número máximo de sitios de unión (Bmax) y la constante de afinidad utilizando el ligando [3H]-2MeS-ADP específico para el receptor de ADP P2Y12. En todos los casos se estudió un control normal (N). En el análisis estadístico se utilizó el test de Spearman y la prueba t de Student. La respuesta al ADP se encontró disminuida en todos los P (0.2 μ M: P 0.1%, N 6% $p < 0.01$ y 0.8 μ M: P 9%, N 26% $p < 0.01$) y correlacionada con el tamaño de la 1ª ola con adrenalina (0.2 μ M: $r = 0.75$ $p < 0.01$ y 0.8 μ M: $r = 0.65$ $p < 0.01$). El Bmax de los P se encontró disminuido con respecto al grupo control (454 \pm 189 y 902 \pm 217 sitios/plaq, respectivamente). Estos resultados estarían sugiriendo que los defectos en la agregación plaquetaria en respuesta a la adrenalina y al ADP estarían relacionados.

INMUNOLOGÍA I

17. Activación de neutrófilos humanos por ADN bacteriano.

Analia Trevani(1), Alejo Chorny(1), Gabriela Salamone(1), Mirta Giordano(1), Mónica Vermeulen(1), Karen Nahmod(1), Romina Gamberale(1), Jorge Geffner(1).

(1) Instituto de Investigaciones Hematológicas - Academia Nacional de Medicina
atrevani@medscape.com

Numerosas evidencias sugieren que el ADN bacteriano, a diferencia del ADN de vertebrados, posee propiedades estimuladoras sobre células B, macrófagos y células dendríticas. En este trabajo, determinamos que el ADN de *E. coli* (ADNEc, 100 μ g/ml), a diferencia del ADN genómico humano (ADNh, 100 μ g/ml) y el de timo de ternera (ADNtt, 100 μ g/ml), induce la activación de neutrófilos humanos. El ADNEc indujo el cambio de forma (FSCM \pm ES: 291 \pm 17, 438 \pm 34*, 291 \pm 18, 292 \pm 19; basal, ADNEc, ADNh, ADNtt, * $p < 0.005$, $n = 9$, evaluado por citometría de flujo), la producción de H2O2 (IFM \pm ES: 6 \pm 1, 24 \pm 7*, 9 \pm 1, 10 \pm 1; basal, ADNEc, ADNh, ADNtt, $p < 0.05$, $n = 4$, determinada por citometría de flujo), la quimiotaxis de neutrófilos (#neutrófilos migrados/campo \pm ES: 3 \pm 1, 19 \pm 8*, 5 \pm 2, 9 \pm 1; basal, ADNEc, ADNh, ADNtt * $p < 0.05$, $n = 4$, evaluada en microcámara de quimiotaxis) y también moduló su sobrevivencia, puesto que indujo la apoptosis luego de 18 hs de cultivo a 37°C (% apoptosis: 23 \pm 9, 59 \pm 7*, 24 \pm 11, 22 \pm 8; espontánea, ADNEc, ADNh, ADNtt, * $p < 0.05$, $n = 7$, determinada por microscopía de fluorescencia). La capacidad estimuladora del ADNEc sobre los neutrófilos humanos, no parece obedecer al mecanismo clásico de activación mediado por la presencia de motivos CpG no metilados, debido a que oligodeoxinucleótidos no metilados con enlaces fosfodiéster, cuyas secuencias incluyen motivos CpG, fueron incapaces de inducir la activación de neutrófilos, aún al emplearse a concentraciones tan altas como 30 μ M.

18. Actividad de la fludarabina sobre monocitos humanos.

Inducción de IL-1b, IL-6, TNFa e IL-10. Paula Fernández Calotti(1), Romina Gamberale(1), Mónica Vermeulen(1), Mariano Scolnik(1), Jorge Geffner(1), Mirta Giordano(1).

(1) Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina
mailto:paulaf@mexico.com

Anteriormente hemos descrito que el análogo de adenosina, fludarabina (FLU) inhibe el aumento de RFcg I y de ADCC inducido por IFNg en monocitos humanos. Para investigar si la FLU interfiere con la activación inducida por LPS, evaluamos la secreción de IL-6, TNFa e IL-12. A tal fin se incubaron 1-2 x 10⁵ monocitos purificados por Percoll durante 48 hs con FLU (0,5 mg/ml) en presencia o no de LPS (1mg/ml) y se dosaron por ELISA las citoquinas liberadas al sobrenadante. Encontramos que la FLU no inhibe sino que aumenta la producción de IL-6 y TNFa inducida por LPS, estimulando además su producción espontánea: niveles de IL-6: 247 \pm 83 vs 577 \pm 298 pg/ml; TNFa: 34 \pm 6 vs 96 \pm 29

pg/ml, Ct vs FLU, $n = 6$, $p < 0.01$. Por el contrario, la FLU no modifica los niveles de IL-12. Para determinar si la FLU actúa a nivel transcripcional, se incubaron células de la línea U937, con FLU (0,2 mg/ml) por 24 hs y se evaluó por RT-PCR la inducción de genes de citoquinas que no se encuentran constitutivamente expresados. Encontramos que la FLU induce la transcripción de ARNm para IL-6, IL-1b e IL-10, no así para IL-4. Esta inducción no se observó con otros agentes pro-apoptóticos como clorambucilo, etopósido o peróxido de hidrógeno. En este trabajo describimos por primera vez una actividad estimuladora de la FLU sobre los leucocitos. Si bien esta droga se ha propuesto como una potencial herramienta terapéutica en patologías autoinmunes e inflamatorias, nuestros resultados sugieren lo contrario.

19. Actividad de la fludarabina sobre monocitos humanos.

Modulación de la sobrevivencia y capacidad funcional. Paula Fernández Calotti(1), Romina Gamberale(1), Mónica Vermeulen(1), Analia Trevani(1), Jorge Geffner(1), Mirta Giordano(1).

(1) Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina
mailto:paulaf@mexico.com

La fludarabina (FLU) es un análogo de adenosina ampliamente utilizado en oncohematología por su capacidad para inducir la apoptosis de las células linfoides. Nuestro objetivo fue determinar si la FLU modifica la sobrevivencia y funcionalidad de los monocitos humanos. Para ello purificamos monocitos de donadores normales por gradientes de Percoll y los cultivamos en presencia de distintas dosis de FLU. Encontramos que la incubación por 48 hs con concentraciones mayores a 1 μ g/ml conduce a la apoptosis celular. A concentraciones no-apoptóticas (0,5 μ g/ml), la FLU no modifica la capacidad endocítica ni fagocítica de los monocitos, evaluadas por citometría de flujo utilizando Dextran-FITC o Zymosan-FITC respectivamente. Por el contrario, el mismo tratamiento inhibe el aumento de RFcg de tipo I (CD64) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) inducidos por interferón g: RFcgI (media de intensidad de fluorescencia) Ct: 397 \pm 50, IFNg: 2114 \pm 297, FLU: 395 \pm 43 y IFNg+FLU: 717 \pm 183, $n = 5$, $p < 0.01$ IFNg vs IFNg+FLU; ADCC: Ct: 26 \pm 4%, IFNg: 63 \pm 12%, FLU: 28 \pm 5% y IFNg+FLU: 38 \pm 5%, $n = 5$, $p < 0.01$. Llamativamente, el aumento en la expresión de ICAM-1 y MHC II inducidos por IFNg no se ven afectados. Estos resultados demuestran que la FLU no sólo es capaz de inducir la apoptosis de los monocitos, sino que además ejerce efectos moduladores selectivos sobre los mismos que podrían tener relevancia durante el tratamiento de los pacientes leucémicos.

20. Empleo preferencial del mecanismo lítico dependiente de FasL/Fas en linfocitos T citotóxicos contra macrófagos (M) pulsados con Mycobacterium tuberculosis (Mtub) en pacientes con tuberculosis.

Silvia S. de la Barrera(1), Marta R. Finiasz(1), Juan M. Iarregui(1), Mercedes Alemán(1), María C. Franco(1), Carla A. Ruschioni(2), María Musella(2), Eduardo Abbate(3), María C. Sasiain(1).

(1) Instituto de Investigaciones Hematológicas «Mariano R. Castex», Academia Nacional de Medicina (2) Servicio de Tisiopneumología, Hospital «Francisco Muñiz» (3) Instituto «Vaccarezza», Hospital Muñiz

Se analizaron los mecanismos usados por linfocitos T CD4, CD8 y gd de pacientes con TBC e individuos sanos (N), para lisar M pulsados con Mtub. Se estudiaron 15 pacientes con TBC: 6 con (P-TB) y 9 sin una TBC previa (TB) y 8 N. Células efectoras, E: PBMC se incubaron con Mtub, 6 días y luego se separaron linfocitos CD4, CD8 y Tgd. (Células blanco, B: M autólogos + Mtub (18 h) y marcados con 51Cr. En el ensayo citotóxico se incubaron 4 h a E y B en relación E: B=40:1 con o sin los Ac anti-Fas (a-F) anti-Perforina (a-P). Los resultados se expresan como % de citotoxicidad (%Cx). Se analizó % de células CD4, CD8 y Tgd que expresaron Fas-L o perforina por citometría de flujo. 1) a-F

inhibió CD4-Cx en TB (31 ± 6 ; + a-F= 3 ± 3), P-TB (28 ± 2 , +a-F= 5 ± 3 , $p < 0.05$) y N (36 ± 3 , +a-F= 8 ± 2 , $p < 0.05$). 2) a-P inhibió CD8-Cx en TB (17 ± 2 , +a-P= 4 ± 1 , $p < 0.05$), P-TB (11 ± 2 , +a-P= 1 ± 1 , $p < 0.05$) y N (30 ± 2 , +a-P= 11 ± 2 , $p < 0.05$). 3) gd -Cx fue inhibida por a-F en TB (25 ± 4 , +a-F= 5 ± 4 , $p < 0.05$) P-TB (44 ± 4 , +a-F= 8 ± 4 , $p < 0.05$) y N (26 ± 3 , +a-F= 5 ± 2 , $p < 0.05$). En P-TB, a-P inhibió a gd-Cx (31 ± 3 , $p < 0.05$). 4) En P-TB, % de células CD8-Perf(+) (15 ± 6 , $p < 0.02$) fue menor que en TB (29 ± 7) y N (45 ± 4). Conclusiones: Los pacientes con TBC y en especial P-TB presentaron un nivel mayor de respuestas citotóxicas dependientes de Fas/FasL que los N, siendo este mecanismo ineficaz para la muerte del Mtub. Este hecho unido a su menor Cx podría explicar la falta de control de la infección en los pacientes aún con conocimiento previo del Mtub.

21. Mecanismos mediante los cuales el N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) inhibe la expresión del FcγRI inducida por IFN-γ en monocitos humanos. Macarena Beigier Bompadre(1), Paula Barrionuevo(1), Fernanda Alves Rosa(1), Carolina J. Rubel(1), Marina S. Palermo(1), Martín A. Isturiz(1).

(1)Academia Nacional de Medicina. Instituto de Investigaciones Hematológicas. División Inmunología. mailto: mbeigier@yahoo.com

Los receptores para la porción Fc de IgG (FcγRs) cumplen un rol importante en la respuesta inflamatoria. En trabajos anteriores demostramos que si se incuban monocitos humanos con FMLP (1×10^{-6} M) durante 1h, se lava y se agrega IFN-γ (240U/ml), se inhibe el aumento en la expresión del FcγRI inducido por IFN-γ al cabo de 24h. En este trabajo observamos que este efecto del FMLP es abolido si las células se incuban previamente con inhibidores de la activación de las MAPKs p38 y Erk1/2 (SB203580 y PD098059). La expresión del FcγRI fue evaluada por citometría de flujo en monocitos purificados por Percoll. Los resultados se expresan como % de MIF del control en un experimento representativo: a) IFN-γ:215; b) FMLP+IFN-γ:150; c) SB203580+FMLP+IFN-γ:187; d) PD098059+FMLP+IFN-γ:200; n=5; a) c) y d) vs b) $p < 0.05$. Inhibidores de la vía de PKC no alteran el efecto del FMLP y tampoco el agregado de cicloheximida. El FMLP no modifica la fosforilación del factor de transcripción STAT1 inducida por IFN-γ (n=4), evaluada por citometría de flujo. Si el FMLP se agrega luego de 24h de incubación con IFN-γ, también se observa la inhibición en la expresión inducida del FcγRI. Los resultados se expresan como % de MIF del control en un experimento representativo: a) IFN-γ:230; b) FMLP+IFN-γ:143;n=16; a) vs b) $p < 0.01$. Conclusión: el FMLP inhibe la expresión del FcγRI por mecanismos tempranos mediados por MAPKs y disminuye el nivel de expresión de los FcγRI ya expresados en la membrana.

22. Mecanismos de regulación de la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en monocitos/macrófagos por complejos inmunes (CI). Paula Barrionuevo(1), Macarena Beigier Bompadre(1), Sonia Gómez(1), Juan Chiesa(1), Marina S. Palermo(1), Martín A. Isturiz(1).

(1)Academia Nacional de Medicina. Instituto de Investigaciones Hematológicas. División Inmunología.

Las MHC-II son esenciales en la respuesta inmune. Anteriormente demostramos que los CI ovoalbúmina (OA)-IgG anti-OA inhiben la expresión basal e inducida por IFN-γ de las MHC-II en monocitos humanos a través de la secreción de proteasas aspárticas y metaloproteasas. La potencial importancia de este efecto justifica un estudio más exhaustivo del mismo. En este trabajo analizamos la especificidad de esos mecanismos, su implicancia in vivo y el efecto de los CI sobre las MHC-II intracelulares. Los resultados obtenidos demuestran que los CI inducen una reducción del 42% (n=17) de las MHC-II en monocitos humanos,

mientras que la participación de prostaglandinas e IL-10 es irrelevante. Esta reducción de las MHC-II por los CI también se manifiesta sobre las MHC-II localizadas en los depósitos intracelulares. El resultado expresado como % de MIF del control \pm SEM fue 57 ± 7 ($p < 0.01$ versus control; n=5). Por otra parte, la reducción de las MHC-II por los CI fue observada en un modelo murino de foco inflamatorio. Los resultados expresados como % de MIF del control \pm SEM fueron: a) CI: 32 ± 9 ; b) IFN-γ: 376 ± 12 ; c) CI+IFN-γ: 56 ± 7 ; n=5; a) versus control $p < 0.01$; b) versus c) $p < 0.01$. Todos estos resultados nos permiten concluir que: 1) La disminución de las MHC-II se debe a la secreción de proteasas inducidas por los CI y descarta otros mecanismos alternativos, 2) Esta disminución de las MHC-II también se observa en los depósitos intracelulares, 3) El efecto es reproducible en un modelo in vivo.

23. Locomoción de leucocitos en el sipuncúlido Themiste petricola inducida por quimiotácticos exógenos y endógenos: papel de la interacción entre el ácido hialurónico y un antígeno CD44 símil. Paula V. Cabrera(1), Guillermo Blanco(1), Glenda Ernst(1), Elida Alvarez(1), Silvia E. Hajos(1).

(1)Cátedra de Inmunología. Facultad de Bioquímica y Farmacia. UBA mailto:paulavc@ffyba.uba.ar

La migración celular es esencial en la defensa de invertebrados. En mamíferos factores endógenos solubles producen el reclutamiento leucocitario hacia sitios de infección. El zimosan activa la producción de C5a. El ácido hialurónico (AH), componente de la matriz extracelular conservado en la evolución, induce la migración mediante su receptor CD44 y aumenta en la inflamación, especialmente como fragmentos de bajo peso molecular. Objetivo: evaluar la migración de celomocitos del sipuncúlido *T. petricola* para estudiar si: el plasma celómico tratado con zimosan presenta actividad quimiotáctica; el AH nativo (AHn) y de bajo peso molecular (AHb) participan en la migración y adhesión de celomocitos; y si anticuerpos anti-CD44 murino, inhiben la adhesión a AH. En cámaras de quimiotaxis observamos que los productos bacterianos fMLP y LPS causaron actividad quimiotáctica exógena (índice de migración (IM): fMLP $50 \mu\text{M}$ 8.9 ± 1.1 ; LPS $5 \mu\text{g/ml}$ 10.3 ± 2), mientras que el plasma tratado con zimosan (PTZ), el AHn y AHb produjeron actividad quimiotáctica endógena (IM: PTZ 3.4 ± 0.06 , AHn 4.5 ± 0.3 , AHb 5.3 ± 0.1). Además, los celomocitos se adhirieron a placas incubadas con AHb. (índice de adhesión (IA) 0.53 ± 0.02) El anticuerpo anti-CD44 murino bloqueó la adhesión a AHb (IA 0.12 ± 0.02) y quimiotaxis hacia ambas formas de AH (IM AHn 0.53 ± 0.06 , AHb 0.52 ± 0.03), indicando que un antígeno CD44 símil podría participar en la locomoción de celomocitos mediada por AH.

24. Infección con Trypanosoma cruzi (Tc) en ratones C57BL/6 pretratados con lipopolisacárido (LPS). Eduardo Roggero(1), Maximiliano Tamae Kakazu(1), Isabel Piazzon(2), Irene Nepomnaschy(2), Jeanne Wietzerbin(3), Silvia S. Revelli(1), Oscar Bottasso(1).

(1)Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario (2)Instituto de Leucemia Experimental, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires (3)Unite 365, Institut Curie, París, Francia Bottasso@arnet.com.ar

Asumiendo que la presencia de factor de necrosis tumoral alfa (FNT) al inicio de la infección con Tc, en condiciones que regulan su acción nociva, mejoraría el curso de la misma y dado que el Tc presenta una estructura símil LPS, se estudió si un esquema de pretratamiento con LPS modificaba la enfermedad aguda. Tres grupos de ratones adultos (n=6-13 c/u) recibieron: una inyección ip de LPS $2 \mu\text{g/día}$, 4 días consecutivos, más una dosis subletal de $200 \mu\text{g}$ al día 5 (Lps), igual procedimiento más inyecciones simultáneas de pentoxifilina (puede atenuar la tolerancia

al LPS) 2mg/vez (LpsPtx); solución fisiológica en los mismos intervalos (Co). La infección se indujo 48 hs después (100 Tc, cepa Tulahuén). Los grupos Lps y LpsPtx mostraron una tendencia similar pero sólo el último difirió estadísticamente de Co, parasitemias (día 14, mediana -rango) LpsPtx=42[27-56], Co=66[51-121] $p<0.01$, mortalidad acumulativa LpsPtx=6/13, Co=12/12, $p<0.005$. La atrofia tímica que se da en este modelo fue menor en LpsPtx ($p<0.05$), al igual que la caída de timocitos CD4+ CD8+ (% por citometría, media±es) LpsPtx 41±2.9, Co 26±2.1, no infectado 77±2.3, $p<0.001$. El grupo LpsPtx tuvo menores niveles séricos de nitratos y factor de necrosis tumoral alfa (FNT), hacia finales de la infección (día 21 pi, FNT Co 1025±101, LpsPtx 705±65, $p<0.05$). El pretratamiento con LpsPtx ejerce un efecto protector sobre la infección aguda a la vez que reduciría el componente tóxico y proinflamatorio de la respuesta anti-Tc.

ONCOLOGÍA I

- 25. La expresión de chimerina B2 (ChiB2) reduce la agresividad de células de carcinoma mamario murino.** Pablo Lorenzano Menna(1), Guillermo Skilton(2), Daniel F. Alonso(2), Marcelo G. Kazanietz(3), Daniel E. Gomez(1).

(1)Laboratorio de Oncología Molecular. Universidad Nacional de Quilmes (2)Laboratorio de Oncología Molecular. Universidad Nacional de Quilmes (3)Centro de Terapias experimentales. Escuela de Medicina de la Universidad de Pennsylvania. mailto:degomez@unq.edu.ar

Las chimerinas pertenecen a una nueva familia de receptores de diacilglicerol y ésteres de forbol, capaces de inactivar a la proteína Rac. Se conoce que Rac actúa como efector de Ras en la transformación maligna y participa en la reorganización del citoesqueleto durante el crecimiento y migración de células tumorales. Se transfectó por lipofección una secuencia del dominio GAP de ChiB2 en cultivos del carcinoma mamario F3II, una línea altamente invasiva y metastásica que expresa muy bajos niveles de chimerinas. Se seleccionaron poblaciones clonales transfectantes y se confirmó la sobreexpresión estable de ChiB2 mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Las células F3II que sobreexpresaban ChiB2 mostraron bajos niveles de Rac activo (Rac-GTP), una menor capacidad proliferativa y un descenso dramático en la migración, evaluada mediante el ensayo 'de herida' de monocapas (Control: 630±56 vs ChiB2: 139±13 células/mm²; $p<0.001$). In vivo, se evaluó la tumorigenicidad en ratones hembra BALB/c inoculando 200.000 células F3II en el espacio subcutáneo del flanco y efectuando autopsias y estudio histopatológico 60 días más tarde. La tasa de crecimiento tumoral fue menor (Control: 0.40±0.04 vs ChiB2: 0.16±0.07 mm/día; $p<0.01$) y no se encontraron signos de invasión local ni metástasis pulmonares en los animales que recibieron células F3II que sobreexpresaban ChiB2. Los resultados sugieren que la expresión de ChiB2 reduce la agresividad del carcinoma mamario F3II

- 26. Detección de mucina 1 (MUC1) circulante y en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama.** María V. Croce(1), Marina Isla-Larrain(2), Adriana Capafons(3), Jorge R. Gori(4), Clemente Sala(5), Amada Segal-Eiras(6).

(1)Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Fac. Cs. Médicas, UNLP (2)Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Fac.Cs. Médicas, UNLP. (3)Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Fac. Cs. Médicas, UNLP. (4)Hospital Alemán, Buenos Aires (5)Hospital San Martín, Fac. Cs. Médicas, UNLP. (6)Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Fac. Cs. Médicas, UNLP. mailto:as-eiras@netverk.com.ar

El propósito de esta investigación fue determinar la expresión concomitante de MUC1 en el suero y tejido tumoral provenientes

de pacientes con cáncer de mama. Se incluyeron 63 muestras tisulares y séricas de carcinoma mamario; se emplearon como controles 5 muestras de tejido normal, 8 de patologías mamarias benignas y 135 muestras séricas de mujeres sanas. La MUC1 sérica se midió por el test de CASA (Cancer Associated Serum Antigen), valor normal máximo (VNM) de 0.4 OD a 405 nm y mediante CA 15-3, VNM=30 U/L y la MUC1 unida a anticuerpos formando complejos inmunes circulantes (MUC1-CIC-IgG/M) mediante ELISA, el VNM para ambos fue de 0.5 OD a 405 nm. Mediante inmunohistoquímica (IHQ) indirecta se estudió la expresión de MUC1 con tres anticuerpos monoclonales (MAbs) anti-MUC1: C595, HMFG1 y SM3. Resultados: el test de CASA fue superior al VNM en 21% de muestras de cáncer y el CA15-3 en el 9% mientras que los CIC fueron elevados en el 70%. Mediante IHQ el 80% de los tumores malignos reaccionaron como mínimo con uno de los MAbs empleados. Se obtuvo una detección simultánea de MUC1 sérica y tisular en el 50% de las muestras; en el 30% sólo hubo expresión tisular y en el 15% sólo se detectó MUC1 en el suero; en el 5% restante no se detectó MUC1. Conclusiones: 1-MUC1 está marcadamente expresada en el cáncer de mama; 2- la MUC1 sérica puede hallarse tanto libre como formando parte de CIC-MUC1 y 3- se halló expresión concomitante en tejido y suero en un alto porcentaje de pacientes.

- 27. Identificación de antígenos asociados a la mucina polimórfica epitelial de tipo 1 (MUC1) en el carcinoma de cabeza y cuello.** María V. Croce(1), Martín E. Rabassa(2), Adrián Pereyra(3), Carlos Pereyra(4), Amada Segal-Eiras(5).

(1)Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Fac. Cs. Médicas, UNLP (2)Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Fac. Cs. Médicas, UNLP. (3)Hospital San Martín, Fac. Cs. Médicas, UNLP. (4)Hospital San Martín, Fac. Cs. Médicas, UNLP (5)Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Fac. Cs. Médicas, UNLP mailto:as-eiras@netverk.com.ar

El objetivo de este trabajo fue identificar antígenos proteicos e hidrocarbonados asociados a MUC1 en el carcinoma de cabeza y cuello. Se estudiaron 29 pacientes con tumores de lengua (n=10), laringe (n=8), cavidad oral (n=4), seno maxilar (n=3), amígdala (n=3) y faringe (n=1); 7 muestras de epitelio normal fueron incluidas como controles. Se empleó inmunohistoquímica (IHQ) y centrifugación diferencial de la que se obtuvieron fracciones subcelulares que fueron fraccionadas por centrifugación en gradientes de densidad en CsCl. Todas las fracciones fueron analizadas por inmunoblotting empleándose los siguientes anticuerpos monoclonales que reaccionan con la porción proteica de MUC1, C595 y con los antígenos hidrocarbonados: hapteno Tn (83D4), Lewis y (C14), Lewis x (KM380) y sialil Lewis x (KM93). El análisis estadístico se realizó aplicando la correlación de Spearman. Mediante IHQ, en las muestras tumorales se identificaron: MUC1, 19/29; hapteno Tn, 12/29; Lewis y, 19/29; sialil Lewis x, 14/29 y Lewis x, 15/29. Estos resultados fueron corroborados por inmunoblotting; la MUC1 se halló en la fracción de densidad en un rango de 1.50 a 1.43 g/ml CsCl. La localización, el tamaño del tumor y el compromiso ganglionar no mostraron diferencias significativas. Las muestras de epitelio normal mostraron escasa reacción. Conclusiones: el carcinoma de cabeza y cuello expresa antígenos proteicos e hidrocarbonados de la MUC1 sin hallarse correlaciones con los parámetros clínicos considerados.

- 28. Presencia de determinantes de oncogenicidad independientes de los determinantes de replicación en virus polioma.** Norberto Sanjuan(1).

(1)Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA. mailto:patoexpe@fmed.uba.ar

Se ha descrito que las cepas altamente oncogénicas de virus polioma son aquellas que previamente se replican en múlti-

plés órganos luego de su inoculación en animales neonatos. No obstante, esto es contradictorio porque las infecciones líticas deberían excluir a las transformantes. En este trabajo se realizaron cultivos organotípicos de glándulas parótidas de ratones C3H BiDa, que fueron infectados con la cepa altamente oncogénica PTA, con la pobremente oncogénica RA o con un mutante puntual en un aminoácido de la proteína mayor de la cápside VP-1 que codifica para VP-1 de RA con el fondo genético de PTA. La infección *in vitro* fue seguida durante 7 días por western blot contra VP-1, inmunocitoquímica y titulación viral. Se observó que tanto PTA como RA y el mutante pueden replicar extensamente en los cultivos organotípicos. Luego, los 3 grupos de tejidos fueron transplantados subcutáneamente en ratones singéncicos. Un cuarto grupo recibió como trasplante glándula parótida no infectada. Luego de 6 meses se observó que el 58% de los ratones que recibieron trasplantes infectados con PTA desarrollaron tumores en el tejido transplantado, mientras que ningún tumor se observó en los explantos infectados con RA o con el mutante. Se concluye que la replicación viral no está necesariamente asociada al desarrollo de neoplasias inducidas por polioma, y se postula que un punto crítico para regular este fenómeno radica en un solo aminoácido de la proteína mayor de la cápside.

29. Identificación de genes diferencialmente expresados asociados al crecimiento tumoral mediado por MPA (Medroxiprogesterona) utilizando la técnica de Hibridización Substractiva (SSH). Mariana Salatino(1), Leticia Labriola(1), Cecilia Proietti(1), Roxana Schillaci(1), Giselle Peters(2), Sogayar Mari(3), Eduardo Charreau(1), Patricia Elizalde(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Instituto de Oncología Angel H. Roffo (3)Departamento de Bioquímica, Universidad de San Pablo
SALATINO@DNA.UBA.AR

En un modelo de carcinogénesis mamaria inducida por MPA en ratones Balb-c estudiamos los genes regulados por MPA al actuar como mitógeno. Para ello, sometimos al RNAm extraído de dos poblaciones tumorales distintas, ratones tratados con MPA (C4HD+) y ratones sin tratar (C4HD-), a la técnica de SSH que permite obtener clones que están expresados en una población pero no en la otra. Primero se convierte el RNAm en cDNA y se efectúa la hibridización entre las dos poblaciones de cDNA, aquellos que no hibridizan son los genes diferencialmente expresados. Amplificando selectivamente las secuencias diferencialmente expresadas se obtuvieron 500 clones de los cuales se identificaron 9 no redundantes, cuyos niveles de expresión estaban aumentados en los tumores tratados con MPA. Mediante secuenciación de los clones y posterior análisis por homología de las secuencias en BLAST se lograron identificar 8 genes. Por análisis de Northern Blot los siguientes genes se confirmaron como expresados diferencialmente en los tumores tratados con MPA: Succinato Deshidrogenasa (1.5±0.4 veces), CTP Sintetaza (1.8±0.1 veces), Calpastatina (2.55±0.8 veces), Caveolina (5.3±1.8 veces), Rát Rieske (1.4±0.9 veces), Hn1 (1.3±0.8 veces) y la Fosfatasa PP1(1.9±0.3 veces)(p<0.001). La caracterización de los genes aislados indica que representan secuencias asociadas a eventos proliferativos y de progresión tumoral, lo que coincide con el hecho de que en este modelo el MPA promueve el crecimiento tumoral.

30. Regulación hormonal de la actividad proteolítica en un tumor de mama progéstgeno dependiente (PD). Marina Simian(1), Claudia Lanari(1), Alfredo A. Molinolo(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental
mailto:msimian@dna.uba.ar

Las metaloproteasas (MMPs) han sido implicadas en la progresión tumoral, asociadas a la angiogénesis, la invasión y la metástasis. Pocos trabajos han analizado el papel de las hormonas esteroideas en la regulación de la actividad proteolítica en tumores de mama hormono-dependientes durante el crecimiento y

la regresión tumoral. El objetivo de este trabajo fue investigar si en un modelo de carcinoma de mama murino PD, las MMPs están reguladas hormonalmente. Se utilizó el adenocarcinoma C4-HD que regresiona con estradiol (E2) y el antiprogéstgeno RU486. Se evaluó la actividad proteolítica por zimogramas de gelatina en extractos de tumores de hembras BALB/c con los siguientes tratamientos: 1) con MPA (20mg depot, sc), 2) sin MPA, 3) con E2 (pellet sc 5mg) y 4) con RU486 (pellet sc 5mg); para los grupos 2, 3 y 4 los tumores se crecieron en presencia de MPA y luego este se extirpó al comenzar el tratamiento que duró 5 días. En todos los casos se detectó actividad de MMP-2 (latente y activa) y MMP-9 (latente). Los niveles totales de MMP-2 aumentaron en un 60% en el grupo 2 respecto del 1 y fueron aún mayores en los grupos 3 y 4 (150% y 120% respectivamente; exp. representativo). Nuestros resultados sugieren que los niveles de actividad de MMP-2 pueden estar modulados por progéstgenos en nuestro modelo tumoral. Estudios a tiempos mas cortos nos permitirán discernir si se trata de un evento temprano involucrado en el proceso de regresión tumoral, o una consecuencia del fenómeno.

31. Disociación *in vivo/in vitro* de la respuesta hormonal en nuevas líneas celulares hormono-responderas de un carcinoma mamario murino. Alejo Efeyan(1), Victoria Fabris(1), Norberto Sanjuan(2), Alfredo A. Molinolo(1), Claudia Lanari(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Facultad de Medicina, UBA

La línea tumoral transplantable C7-2-HI se originó de un carcinoma mamario murino ductal metastásico, inducido por acetato de medroxiprogesterona (MPA); expresa re-ceptores de progesterona (RP) y de estrógenos alfa (RE) y regresiona con mifepristona (MIF) y 17-beta-estradiol (E2). Se establecieron las sublíneas celulares MC7-L2 y MC7-L3, de morfología epitelioide *in vitro* y citoqueratina positivas. Por western blot, inmunocitoquímica y binding de célula entera (RP; MC7-L2: 29±3 fmol/105cél, MC7-L3: 9±2 fmol/105cél y RE; MC7-L2: 19±5 fmol/105cél y MC7-L3: 15±2 fmol/105cél) expresan altos niveles de RP y RE. *In vitro* E2 y MIF (10-13 - 10-7M) estimulan la incorporación de H3-timidina y MPA inhibe (Ej.: Control 1176±115 cpm, E2 10-13: 2244±232 cpm, p<0.01; Control: 2281±218 cpm, MPA 10-9: 888±188 cpm, MPA 10-13: 1011±242 cpm, p<0.001). Esta respuesta es opuesta a la del tumor parental *in vivo*. Ambas líneas son hipotetraploides (ratón normal 2n=40), con tres cromosomas marcadores y tumorigénicas; en hembras BALB/c originan carcinomas ductales, metastásicos en pulmón. Ensayos preliminares señalan que inoculadas *in vivo*, no responden a los mismos tratamientos hormonales que *in vitro*. Se concluye que estas líneas son una buena herramienta para estudiar efectos moduladores de E2 y progéstgenos *in vitro*, y se demuestra nuevamente la falta de co-relación entre los resultados *in vivo* e *in vitro* al trabajar con líneas celulares y efectos hormonales.

32. Identificación por FISH (hibridización *in situ* fluorescente) de cromosomas marcadores en un carcinoma mamario murino progéstgeno-dependiente. Victoria Fabris(1), Catherine Keck(2), Marcelo Aldaz(2), Susana Merani(3), Claudia Lanari(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)M.D. Anderson Cancer Center, Texas (3)Facultad de Medicina, UBA
mailto:vfabris@dna.uba.ar

Estudios previos del carcinoma mamario murino progéstgeno-dependiente C4-HD, inducido por acetato de medroxiprogesterona, y de las líneas celulares epiteliales derivadas, MC4-L1, MC4-L2, MC4-L3 y MC4-L5, revelaron la presencia de cuatro cromosomas marcadores comunes (M1-M4). Por bandeó G se habían identificado parcialmente dichos marcadores. La región terminal de M3 y M4 no pudo homologarse con ningún cromosoma utilizando el patrón de bandas G. La técnica de FISH había confirmado la presencia del cromosoma 10 en una de las translocaciones (M1). Para

identificar completamente los marcadores M3 y M4, así como también los cromosomas marcadores particulares de las líneas celulares, se realizó la técnica de FISH utilizando sondas específicas para cada cromosoma. La línea MC4-L1 presentó el cromosoma 10 del marcador M1 translocado con el cromosoma 6, la línea MC4-L2 presentó una translocación entre los cromosomas 1 y 18, mientras que en la línea MC4-L5 se observó una translocación entre los cromosomas 7 y 15. Se confirmó la participación del cromosoma 17 en el marcador M2 y de los cromosomas 4 y 6 en los marcadores M3 y M4 respectivamente. Se encontró además que los cromosomas 5 y 12 están involucrados en el marcador M3, y que el cromosoma 8 lo está en el marcador M4. El conocimiento de los cromosomas y los puntos de ruptura de las translocaciones que dieron origen a dichos marcadores permitiría identificar genes relacionados con el proceso neoplásico.

GASTROENTEROLOGÍA I

33. Aines inhibidores selectivos COX-1 o COX-2, sin daño gastrointestinal, en ratas. Oscar Laudanno(1), Gabriela Piombo(1), José Cesolari(1), Alicia Godoy(1).

(1)Gastroenterología Experimental. Facultad Ciencias Médicas. Rosario. UNR.
olaudanno@fmedic.unr.edu.ar

Estudiar Aines inhibitorios selectivos COX-1 o COX-2 en comparación con Aines inhibidores de ambas COX, en el daño gastrointestinal (Gi) y neutrofilia. Ratas Wistar (n = 7 c/grupo), 200g, ayuno 24 hs. excepto agua ad-libitum, se realizó: 1. Vehículo. Carboximetilcel 1%. 1ml sondaje orogástrico (OG) en bolo y se esperó 24 hs. 2. Ketorolac (Ke) 3mg/Kg (inhibidor COX-1, 15 y 25mg/Kg OG. 3. Dexketoprofeno (De) 3, 15 y 25 mg/Kg OG. 4. Indometacina (In) 25mg/Kg (Inhib. COX-1 - COX-2). 5. Celecoxib (Ce) (inhib. COX-2) 15mg/Kg OG. 6. Ke (3mg/Kg) + Ce. 7. De (3mg/Kg) + Ce. 24 hs. después sobredosis de éter, laparotomía, punción cardíaca, gastroenterectomía total, su apertura y fotografía, tabulación % área lesional macrosc. Gi, por planimetría, posterior histología y MPO. Se halló que Ke y De a 3mg/Kg no dieron lesiones Gi ni neutrofilia; en cambio, Ce sólo neutrofilia (700 vs. 5.300 / P<0.001) y la MPO (-). Ke a 15 y 25mg/Kg dieron marcada lesiones Gi, neutrofilia (4.700) y evidente MPO (1 vs. 281 U/100mg proteína) (P<0.001), similar a In; así como, tanto Ke + Ce y De + Ce dieron marcado daño Gi; neutrofilia y MPO similar a In. Se concluyó que Aines inhibidores selectivos COX-1 o COX-2 no dan daño Gi; en contraste, el daño Gi producido por la inhibición de ambas COX.

34. Papel de la deslocalización del transportador canalicular de sales biliares (SB) BSEP en la colestasis inducida por 17-glucurónido de estradiol (17GE): Su prevención por AMPc. Fernando A. Crocenzi(1), Luis M. Veggi(1), Jingsong Cao(2), Mary Vore(2), Roger Coleman(3), Aldo D. Mottino(1), Marcelo G. Roma(1).

(1)Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) - CONICET - Fac. de Cs. de Bioq. y Farmacéuticas, UNR (2)Graduate Center for Toxicology, University of Kentucky, U.S.A. (3)School of Biosciences, The University of Birmingham, U.K.
mailto:fcrocenzi@fbiof.unr.edu.ar

El rol de los cambios en la localización celular de BSEP en la colestasis aguda inducida por 17GE, al igual que la capacidad de AMPc para prevenirlos, no han sido explorados. Analizamos 'in vivo' el flujo biliar (FB), el contenido de BSEP en membrana microsomal (Western blotting) y su localización celular (inmunohistoquímica de fluorescencia) en la fase aguda (20 min) de la colestasis inducida por 17GE (15 µmol/kg, i.v.) en la rata, así como el efecto del tratamiento con dibutilil-AMPc (DB-AMPc), un análogo permeable de AMPc (20 µmol/kg, i.v., 30 min antes de 17GE). 17GE disminuyó el FB respecto del control (C, solvente de 17GE) (-87 ± 17%; p<0.05) e indujo deslocalización de BSEP

desde la membrana canalicular hacia vesículas intracelulares, con el consiguiente aumento del contenido microsomal de BSEP (+55 ± 18 %; p<0.05). Luego del pretratamiento con DB-AMPc, 17GE disminuyó el FB solo un 22 ± 12% (p<0.05 vs 17GE), previniendo sustancialmente el aumento de BSEP en microsomas y su deslocalización. En estudios 'in vitro' en duplas aisladas de hepatocitos (DAH), 17GE (50 µM) disminuyó el % de DAH que acumularon apicalmente la sal biliar fluorescente colililifluoresceína (-57 ± 3%; p<0.05) e indujo deslocalización de BSEP; DB-AMPc (10 µM) previno casi totalmente ambos efectos. Los resultados sugieren que cambios en la localización de BSEP juegan un rol en la colestasis por estrógenos y abren expectativas en el uso de análogos, o agentes elevadores de AMPc, en su prevención.

35. Efectos centrales y periféricos del Péptido Natriurético tipo C (CNP) sobre la secreción biliar en la rata. María E. Sabbatini(1), Marcelo S. Vatta(2), Myrian R. Rodriguez(2), Cristina Vescina(3), Belisario E. Fernández(4), Liliana G. Bianciotti(4).

(1)Cátedras de Fisiología y Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. (2)Cátedras de Fisiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. (3)Cátedra de Química Analítica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. (4)Cátedras de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.
lbianc@ffyba.uba.ar

OBJETIVO: Estudiar los efectos centrales y periféricos de CNP sobre la secreción biliar. MATERIALES y METODOS: Ratas SD se canularon en el ventrículo lateral. A la semana, se canuló el conducto biliar recogiendo bilis durante 30 min después de la infusión icv de CNP (1, 10 y 100 ng/microl). En otro grupo se canuló la vena yugular y el conducto biliar recogiendo bilis luego de la administración ev de CNP (1, 5 y 7 microg/Kg). Los resultados son $X \pm SEM$ (*: p<0.05). RESULTADOS: El CNP disminuyó la secreción biliar (microl/min/100 g) administrado icv (30': control 4.6±0.2 vs CNP 1 ng 3.6±0.1*; 10 ng 2.91±0.07*; 100 ng 3.6±0.1*) y ev (30': control 4.9±0.1 vs CNP 5 microg 4.0±0.2*; 7 microg 3.8±0.2*). El CNP disminuyó la excreción de ácidos biliares (micromol/min/100 g) administrado icv (30': control 129.9±5.06 vs CNP 100 ng 88.2±6.5*) y ev (30': control 99.9±6.0 vs CNP 5 microg 67.0±4.1*). No varió la excreción de fosfolípidos. El CNP icv incrementó el pH biliar (30': control 7.94±0.03 vs CNP 100 ng 8.24±0.10*). CONCLUSION: La administración central y periférica del CNP disminuye la secreción biliar. El efecto central fue más pronunciado que el periférico sustentando que es el principal péptido natriurético cerebral.

36. Alteraciones de la barrera hematoencefálica en dos modelos de hipertensión portal: prehepática y hepática con daño severo. Francisco Eizayaga(1), Camila Scorticati(1), Juan Prestifilippo(1), Andrea Ruibal(1), Carolina Santos(1), Salvador Romay(1), José Casro(2), Abraham Lemberg(1), Juan Perazzo(3).

(1)Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA (2)Cátedra de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA (3)Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA
franciseizyaga@radar.com.ar

INTRODUCCIÓN: En trabajos previos demostramos cambios histológicos en barrera hematoencefálica (BHE) de ratas con estenosis reglada de vena porta (ERVP). OBJETIVOS: estudiar la BHE e indicadores de encefalopatía (EH) en ERVP, en un modelo de EH por paracetamol (APAP) y la combinación de ambos. MÉTODOS: Se usaron ratas Wistar de 250g, divididas en 4 Grupos (n=6/8): I) Sham; II) ERVP; III) APAP; IV) ERVP+APAP. Se evaluó contenido de H2O en corteza cerebral (gravimétrico), ASAT, ALAT y NH4 (Enzimático), Conductuales (Animex, reflejos de enderezamiento, corneano, doloroso y Rotarod),

histopatología hepática y test de integridad de la BHE por Trypan Blue (TB) (Reynolds). RESULTADOS: (X±DS), %H₂O/g cerebro: GI: 78,95±0.18. GII:79,21±0.20. GIII: 79,89±0,19*. GIV: 79,67±0,11*; NH4+ (µM/l). GI: 23±9. GII: 79±15*. GIII: 72±14*. GIV: 101±11*;ASAT(U/l), GI: 267±42. GII: 462±88. GIII:734±63*. GIV: 655±58*. ALAT (U/l) GI: 83±9. GII: 135±19. GIII: 286±42*. GIV: 328±61*. Histología: GI normal. GII: necrosis focal mínima. GIII: necrosis hemorrágica difusa. GIV: necrosis focal hemorrágica confluyente. Animex y Reflejos n.s.Rotarod: Tiempo 1ra. caída GI 47.5, Med. 45; GI 264.17, Med 300*, (Dunn no param.). Resto n.s. (*p<0,05 vs GI) TB: GI: Normal. GII, III y IV: TB +: difusión en áreas perivasculares e hipocampo. CONCLUSIONES: En estos modelos estos datos sugieren un grado de encefalopatía subclínica con alteración de la BHE.

37. Transporte de taurocolato de sodio (TC) en intestino de ratas madres durante la lactancia. Aldo D. Mottino(1), Tim Hoffman(2), Paul A. Dawson(3), Marcelo G. Luquita(1), Juan A. Monti(1), Enrique J. Sánchez Pozzi(1), Viviana A. Catania(1), Jingsong Cao(2), Mary Vore(2).

(1)IFISE (CONICET) - Fac. Cs. Bioq. y Farm. (UNR)
(2)Graduate Center for Toxicology. University of Kentucky (USA)
(3)School of Medicine. Wake Forest University. Winston - Salem (USA)
ifise1@citynet.net.ar

La secreción biliar de sales biliares como el TC está aumentada en ratas madres durante la lactancia, en asociación con la incrementada absorción de lípidos dietarios a nivel intestinal. En este trabajo se analizó la capacidad de ratas madres lactantes 14 a 21 días después del parto (L, n=4) para reabsorber TC a nivel ileal, etapa esencial en la recuperación del TC de origen biliar. Se utilizaron para ello los modelos de saco intestinal aislado y de vesículas de membrana apical de enterocito. También se evaluó la expresión del transportador apical de sales biliares (tasb) por western blot. Como controles (C, n=4) se utilizaron ratas hembras normales. El transporte de TC en asa intestinal (nmol/min/g tejido) fue mayor para L (2,6±0,5, media±DE) que para C (1,7±0,3), (p<0.05). La captación de TC por vesículas de membrana apical (pmol/min/mg prot) fue también mayor para L (1030±45) que para C (720±28), (p<0.05). El contenido de tasb en membranaapical, evaluado por densitometría (unidades arbitrarias), fue mayor en L (300±55) que en C (195±35), (p<0.05). Se concluye que el aumento en el transporte de TC en L podría ser consecuencia del aumento en la expresión del transportador tasb. El aumento en la capacidad de reabsorber TC a nivel ileal durante la lactancia resulta esencial en la preservación del pool de sales biliares, particularmente en condiciones de incrementada secreción biliar en respuesta a la demanda dietaria.

38. Desarrollo de un modelo de falla hepática aguda experimental aplicable al trasplante hepatocelular (HTC) y al hígado bioartificial (BAL). Valeria Sigot(1), María G. Mediavilla(1), Alejandra B. Quintana(2), Alejandra I. Martínez(2), Joaquín V. Rodríguez(3), Edgardo E. Guibert(1).

(1)Biología Molecular, Fac. Cs. Bioquím. y Farm. UNR
(2)Morfoloía, Fac. Cs. Bioquím. y Farm. UNR
(3)Farmacología, Fac. Cs. Bioquím. y Farm. UNR
vsigot@fbiof.unr.edu.ar

Entender y tratar la falla hepática (FH) aguda se limita por la falta de modelos animales adecuados. Este modelo de FH aguda debe ser reproducible y evolucionar irreversiblemente a la muerte, con mínimo daño del operador y brindar una ventana terapéutica de tiempo que pueda revertirla con BAL o HTC. Se caracterizó la evolución de la FH inducida por métodos quirúrgicos y/o químico. En ratas Wistar, macho, adultas, inducimos la FH con a) períodos variables de isquemia caliente (0 a 3 hs) seguidos de reperusión, por obstrucciones parciales o totales de la circulación portal; b) administrando acetaminofeno (AAP) (0,8-2,0 g/kg, i.p.).

La evolución de la FH se determinó por los valores de las transaminasas séricas (TS), la histología hepática y el comportamiento de los animales. Entre los 60' y las 3 hs de isquemia caliente, seguidas de 24 hs de reperusión, se elevan las TS, sin entrar en coma, con presencia de focos necróticos hepáticos, revertiendo el cuadro enzimático a los 7 días. Con AAP en dosis crecientes se elevan las TS y los animales entran en coma. Histológicamente se observó pérdida de límites celulares y reducción del calibre sinusoidal. Con dosis menores a 1,1 g/kg la concentración plasmática de AAP es indetectable (< 50 µg/ml) a las 24hs. La dosis de 1,1 g/kg es la mínima que otorga la ventana terapéutica entre 24 y 48 hs con mortalidad >80% y establecería una FH aguda apta para desarrollar el BAL y HTC.

GENÉTICA I

39. Asociación entre el gen del receptor beta3-adrenérgico (RB3A) y la obesidad central en adolescentes. Patricia I. Porto(1), Silvia I. García(1), María S. Landa(1), Guillermo Dieuzeide(2), Natalia Stepat(1), Claudio Gonzalez(1), Mariano Schuman(1), Carlos J. Pirola(1).

(1)Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari. Facultad de Medicina, UBA. (2)CAIDEM, Chacabuco, Pcia Bs As.
mailto:cjpirola@ciudad.com.ar

La HTA esta fuertemente asociada a obesidad. Previamente detectamos que el 5% de la población estudiantil secundaria de Chacabuco es hipertensa (PAS >percentilo 95 para su edad y sexo) hecho correlacionado con un aumento del índice de masa corporal (BMI). En este estudio evaluamos la asociación de la variante Trp64Arg del gen del RB3A (PCR y RFLP/BstO1) con obesidad e hipertensión en 175 adolescentes (121 normotensos, 15±2 años, 71 mujeres y 54 hipertensos, 15±2 años, 22 mujeres; ambos grupos difieren en el BMI, triglicéridos, HDL). No se encontró ninguna asociación entre la HTA, el BMI o los niveles de leptina circulantes con los genotipos del RB3A. Sin embargo, la relación cintura/cadera (RCC) que fué mayor en los hipertensos y varones correlacionó (R de Spearman: 0.20, p<0.01) con la variante Arg64 del RB3A independientemente de la presencia de HTA y del sexo (ANOVA). Mediante análisis de regresión logística se muestra que tomando obesidad central como una RCC>0.80, la variante del RB3A conferiría un riesgo de padecerla mayor a 1.3 por dosis del alelo (OR: 3.37, IC95%: 1.29-8.82) en forma independiente de la edad, el sexo, la presencia de HTA, la relación insulina/glucosa o leptina plasmática. Estos resultados muestran que en adolescentes el agregado de HTA y desórdenes metabólicos asociados (el síndrome metabólico), en particular, la obesidad central estaría condicionada, por lo menos en parte, por la variabilidad genética donde el RB3A jugaría un papel importante.

40. Localización de cromosomas sexuales en gónadas disgenéticas por hibridación in situ fluorescente (FISH). Correlación del desarrollo tumoral con expresión del cromosoma Y. Patricia M. Muzulin(1), María Mühlmann(2), Graciela Del Rey(1), Alicia Martínez(1), Ana Keselman(1), Luis Zuccardi(1), María E. Escobar(1), Héctor E. Chemes(1).

(1)Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de niños R. Gutiérrez. (2)Centro Atómico Constituyentes. Comisión Nacional de Energía Atómica.
pmuzulin@cedie.org.ar

La presencia de cromosoma Y en gónadas disgenéticas aumenta el riesgo de gonadoblastoma (GA), ya que cerca de su centrómero está la región crítica para el desarrollo de este tumor. El GA es tumor benigno que se puede malignizar a disgerminoma (DIS). Nuestro objetivo fue establecer el cariotipo gonadal por FISH con sondas centroméricas de los cromosomas X e Y sobre tejido incluido en parafina y compararlo con el fenotipo gonadal. En todos los casos se detectaron mosaicos 45X/46XY en sangre

periférica. Se estudiaron 3 Síndromes de Turner (ST), que presentaron: Caso 1, cintilla (CINT) bilateral; Caso 2, CINT+GA bilateral y Caso 3, CINT+GA derecho y CINT+GA+DIS izquierdo; y un paciente, Caso 4, con Diferenciación Gonadal Asimétrica (CINT+GA). La cuantificación del FISH mostró los siguientes porcentajes de células con Y: Caso 1 CINT: 17%, Caso 2 CINT+GA: 25%, Caso 3: CINT+GA (der) 38% y CINT+GA+DIS (izq) 60%, y Caso 4 CINT+GA: 3%. Concluimos que en el Síndrome de Turner existe una correlación directa de la expresión cuantitativa del cromosoma Y en tejido con el desarrollo tumoral, observándose el mayor porcentaje en las gónadas con GA, y el valor más alto en el GA+DIS. El cromosoma Y se halló presente también en el GA de la Diferenciación Gonadal Asimétrica, aunque aquí en menor cantidad. Nuestros resultados sugieren una asociación entre la sobrerrepresentación del cromosoma Y, posible portador del gen del gonadoblastoma, y el desarrollo de tumores en gónadas disgenéticas.

41. Identificación de una nueva mutación en el gen del receptor beta de hormonas tiroideas. Carina M. Rivolta(1), Viviana Herzovich(2), Cristina Feijoo(3), Juan M. Lazzati(4), Sonia Iorcansky(4), Christian M. Moya(5), Héctor M. Targovnik(6).

(1)*Cátedra de Genética y Biología Molecular- Facultad de Farmacia y Bioquímica- U.B.A.* (2)*Laboratorio de Pesquisa de Enfermedades Congénitas, Endocrinología. Hospital de Pediatría J.P. Garrahan* (3)*Servicio de Endocrinología. Hospital Int. Gral. de Agudos Eva Perón.* (4)*Laboratorio de Pesquisa de Enfermedades Congénitas, Endocrinología. Hospital de Pediatría J.P. Garrahan.* (5)*Cátedra de Genética y Biología Molecular-Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.B.A.* (6)*Cátedra de Genética y Biología Molecular- Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.B.A. mailto:crivolta@huemul.ffyb.uba.ar*

La resistencia generalizada a hormonas tiroideas (GRTH) se caracteriza por un nivel elevado de T4 y T3 junto a una reducida respuesta de los tejidos a la acción hormonal. Mutaciones puntuales en el gen del receptor beta de hormonas tiroideas (TRB) se asocian con esta patología. Dos familias con un cuadro clínico compatible con GRTH, no relacionadas, fueron estudiadas. En ambas, los pacientes afectados presentaban niveles elevados de T4 y T3 y TSH de valor normal. Con el fin de estudiar las alteraciones moleculares causantes de la enfermedad, se purificó ADN a partir de sangre periférica y se amplificaron los exones 9 y 10 del gen del TRB por PCR. El posterior secuenciamiento identificó 2 mutaciones en el exón 10, correspondiendo esta región al dominio LBD (Ligand Binding Domain). En una de las familias se halló en el hijo afectado una nueva mutación heterocigota que origina una sustitución de la isoleucina 431 por metionina (transición A-G) en la posición 1578 del ARNm. No aparece en los padres indicando un origen de novo. En la otra familia se identificó una mutación también heterocigota que conduce al cambio de la prolina 453 por treonina (transversión C-A) en la posición 1642 del ARNm, que está presente en el padre, sus tres hijas afectadas y ausente en la madre. En el 90% de casos de GRTH no existen síntomas y signos patognomónicos por lo cual la identificación de nuevas mutaciones en el gen TRB aumentará la precisión en el diagnóstico de esta patología.

42. Diagnóstico molecular de Enfermedad de Huntington. Viviana Varela(1), Ariel P. López(1), Liliana G. Alba(2), Héctor M. Targovnik(1).

(1)*Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA* (2)*Centro Nacional de Genética Médica, A.N.L.I.S., «Carlos G. Malbrán» vvarela@ffyb.uba.ar*

La enfermedad de Huntington (HD) se hereda en forma autosómica dominante y se manifiesta en edad adulta y se caracteriza por alteraciones neurodegenerativas que evolucionan hacia la demencia. El defecto genético está asociado con la ex-

pansión del número normal de repeticiones del triplete CAG (que codifica para glutamina) en el primer exón del gen IT15, localizado en el cromosoma 4p16.3. Los alelos normales presentan de 11 a 26 repeticiones y la expansión de tripletes en un número mayor a 41 indican la presencia de la enfermedad. El objetivo del presente estudio fue determinar el número de repeticiones CAG, presentes en 7 pacientes con diagnóstico clínico de HD y en 20 individuos de nuestra población. Se realizó una amplificación por PCR a partir de ADN, con los primers HD3 y HD5, flanqueantes a la región polimórfica, en presencia de Elongase Enzyme Mix y dATP[a-32P]. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de policríalimida al 6% en condiciones desnaturalizantes. Los 7 pacientes presentaron genotipos heterocigotas, con 7 alelos en el rango de 13 a 21 repeticiones y 7 expandidos en el rango de 41 a 52 repeticiones. Los 40 alelos de la población normal presentaron repeticiones en el rango 13-26; el alelo más frecuente fue de 18 repeticiones (n=9). Se destaca el valor del diagnóstico molecular para poder realizar un correcto asesoramiento genético en afectados y su grupo familiar.

43. Hallazgo de una misma mutación germinal en Retinoblastoma clinicamente Hereditario y No Hereditario. Viviana K. Dalamón(1), Ezequiel I. Surace(1), Florencia Giliberto(1), Verónica Ferreiro(1), Javier H. Cotignola(1), Gloria A. Machiavelli(2), Irene Szijan(1).

(1)*Cátedra de Genética y Biología Molecular, Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA* (2)*Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas vdalam@ffyb.uba.ar*

Se presenta el estudio de dos pacientes con Retinoblastoma. Un caso clasificado como Hereditario acorde a las características clínicas de presentación: bilateral, con antecedentes, detectado a los 2 meses de edad (una mutación en el gen RB1 sería germinal y otra somática). Un caso clasificado como No Hereditario: unilateral unifocal, sin antecedentes, detectado a los 3 años de edad (ambas mutaciones en el gen RB1 serían somáticas). Se analizó ADN de leucocitos de los pacientes mediante la técnica de prescreening por heteroduplex para los 27 exones del gen RB1 y se secuenciaron los exones con un patrón alterado de corrida. Sorpresivamente el análisis evidenció una misma mutación en los dos pacientes (150037 CxT en el codón 579, exón 18) que genera un cambio del codón Arg por Stop, lo que se traduciría en una proteína trunca, posible responsable de la tumorigénesis. El hallazgo de esta mutación en el ADN de leucocitos de los pacientes demostraría que es de origen germinal (estaría presente en todos los tejidos). El caso clasificado como No Hereditario presentaría una mutación tumorigénica en todos sus tejidos, por lo que debería reclasificarse como Hereditario de novo, replanteando el asesoramiento genético tanto para el afectado como para sus parientes. Cabe destacar que la misma mutación germinal está relacionada con fenotipos disímiles. Es la primera vez que se describe una mutación germinal en pacientes con retinoblastoma unilateral de presentación tardía.

44. Detección de mutaciones en el sitio 'hot spot' del ret proto-oncogen, relacionado con Neoplasias Endócrinas Múltiples Tipo IIA, mediante PCR mutagénico. María Roqué(1), Clara Pott Godoy(1), Eduardo Pusiol(1), Luis S. Mayorga(1).

(1)*Laboratorio de Biología Celular y Molecular Facultad de Cs Médicas Universidad Nacional de Cuyo*

Introducción: MEN IIA es una enfermedad autosómica dominante. Se caracteriza por el desarrollo de cáncer medular de tiroides (CMT), feocromocitoma e hiperplasia de paratiroides. Mutaciones en el proto-oncogen ret se asocian con MEN IIA. En un 90% de los casos ocurren en el codón 634. Nuestro objetivo fue diseñar una estrategia para detectar mutaciones en este sitio 'hot-spot'. Materiales: se obtuvo ADN de tres pacientes con MEN IIA, cada uno con una base distinta del codón 634 mutada. Se amplificó por PCR el codón 634 mediante cebadores

mutagénicos y se incubó con las enzimas BstApl y Bgll. Se analizaron los fragmentos en geles de poliacrilamida. Resultados: la estrategia consistió en introducir parte de dos sitios de restricción durante la PCR, que son completados por el codón 634 sano. El sitio para la enzima BstApl es alterado por mutaciones en cualquiera de las tres bases del codón. El segundo sitio para la enzima Bgl I es alterado por cualquier mutación en las dos últimas bases del codón. Una muestra control salvaje fue clivada en su totalidad por la enzima BstApl y las muestras portadoras de una mutación fueron sólo parcialmente cortadas por la misma. En la incubación con la enzima Bgll, muestras portadoras de una mutación en la segunda o tercera base del codón fueron sólo parcialmente clivadas. Conclusiones: la estrategia desarrollada permite de manera sencilla chequear (doblemente) la integridad de este sitio 'hot spot' y detectar casos de CMT hereditario

INMUNOLOGÍA II

45. Diferencias regionales de células T y B en el tracto respiratorio de ratas Wistar. Gustavo A. Sosa(1), María G. Márquez(2), María E. Roux(1).

(1)Lab. de Inmunología Celular, Depto. de Ciencias Biológicas, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA (2)Biología Celular e Histología, Depto. de Ciencias Biológicas, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA
mailto:gsosa@ffyba.uba.ar

En el tracto respiratorio de ratas hay dos tejidos del sistema inmune común de mucosas (SICM): el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT) y el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT) que se asemejan en su ontogenia y se diferencian en las subpoblaciones T y B. Objetivo: determinar las alteraciones provocadas por inmunodeficiencia secundaria por déficit proteico severo al destete, seguida por renutrición con caseína 20% durante 21 días (R21), respecto de controles de igual edad (C60). Los tejidos fueron procesados según Sainte-Marie y caracterizados por inmunofluorescencia indirecta. Resultados: BALT (X±E.S. de células en 15 campos, C60 vs R21, n=5) CD4: 151,4±3,3 vs 104,2±5,9, p=0,0001; CD8a 259,4±14,0 vs 140,0±10,2, p=0,0001; TCRgd: 121,2±4,0 vs 172,2±13,1, p=0,0058; TCRab: 164,8±11,4 vs 127,4±10,3, p=0,0409; IgA: 397,3±37,7 vs 270,1±22,5, p=0,020. NALT (X±E.S. de células en 5 campos, C60 vs R21, n=5) CD4: 49,6±2,7 vs 34,4±3,8, p=0,0065; CD8a: 42,7±3,2 vs 42,4±5,3, p=NS; TCRgd: 44,6±5,3 vs 30,0±2,2, p=0,0356; TCRab: 51,0±5,0 vs 27,8±1,9, p=0,0034; IgA: 30,5±3,2 vs 28,3±3,4, p=NS. Conclusiones: En animales R21 se determinó que solo en NALT: a) existe disminución de linfocitos T CD4 no acompañada por disminución de linfocitos B IgA; b) la población CD8a permanece igual a C60; y c) las subpoblaciones ab y gd permanecen disminuidas. Estas diferencias indican la existencia de compartimentación en la repoblación de estos dos tejidos del SICM. CONICET PIP4147 y UBA TB72.

46. Caracterización del infiltrado hepático de células mononucleares en Hepatitis autoinmune pediátrica tipo I. María De Biasio(1), Natalia Paladino(1), Gabriela Dorn(2), María García de Dávila(2), Alejandra Avagnina(1), Leonardo Fainboim(1), Alejandra C. Cherñavsky(1).

(1)Hospital de Clínicas «José de San Martín». Servicio de Inmunogenética (2)Hospital de Pediatría «J.P.Garrahan». Servicio de Patología
mailto:accher@fibertel.com.ar

La hepatitis autoinmune (HAI) tipo I es una patología hepática con características clínicas y genéticas diferentes entre sus formas pediátrica (HAIp) y adulta (HAIa) que responde ante el tratamiento inmunosupresor. Nuestro objetivo fue evaluar las características inmunofenotípicas del infiltrado hepático de células mononucleares en espacios portal (EP), periportal (EPP) y lobulillar (EL). La distribución de los antígenos CD45 (LCA), CD3, CD4, CD8, CD20, Fas-L y CD57 fue evaluada por inmunohistoquímica en

biopsias hepáticas de diagnóstico provenientes de 5 pacientes de 9 años de edad promedio (rango 4 -13) y comparada con la distribución en biopsias provenientes de pacientes adultos (HAIa) de 43 años de edad promedio (rango 17-59). En ambas formas de la enfermedad el mayor índice de actividad histológica necroinflamatoria se correlacionó con la mayor expresión de CD45. LTCD3+ predominan en EP, en HAIP; pero en EPP, en HAIa. El predominio de LTCD4+ es portal (HAIP y HAIa) y el de LTCD8+ es periportal (HAIP y HAIa). La expresión de CD20+ es leve en EP, EPP y EL en HAIP, pero moderada y con predominio portal en HAIa. FasL se distribuye homogéneamente (EP, EPP y EL) en HAIP y HAIa. CD57 predomina en HAIP severas (EP). El infiltrado celular en HAIP está constituido por LTCD45+: CD3+ (CD4+ y CD8+), LBCD20+ y NKCD57+. El mecanismo de lesión hepática en HAIP involucraría a las mismas poblaciones celulares que en HAIa, con algunas diferencias en distribución y proporciones relativas.

47. Modulación diferencial de la Uveitis Autoinmune Experimental por Galectina-1 recombinante y un antagonista de VLA-4. Luciana D. Viera de Moraes(1), Andrea P. Martín(2), Luiz V. Rizzo(1), Natalia Rubinstein(3), Gabriel A. Rabinovich(3), Horacio M. Serra(2).

(1)División Alergia e Inmunología Clínica, Fac. Medicina, Universidad de San Pablo, Brasil. (2)Inmunología, Fac. Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (3)Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas «José de San Martín», Universidad Bs. Aires.
amartin@bioclin.fcq.unc.edu.ar

La Uveitis Autoinmune Experimental (UAE) es una reacción tipo T1 similar a la uveitis humana. Distintas terapias supresoras se han intentado con variados resultados. Los efectos inmunomoduladores de galectina-1 (Gal-1) y péptido antagonista de VLA-4 (a-VLA) fueron investigados en este modelo. La UAE fue inducida en ratones B10.A con IRBP en el día 0. Los animales fueron divididos en 6 grupos e inyectados (ev) con 5 ug de Gal-1, 10 mg de a-VLA o placebo los días 2, 4 y 6 (fase aferente) o 14, 16 y 18 (fase eferente). Manifestaciones clínicas, DTH, anticuerpos séricos, respuesta proliferativa (RP) y de citocinas en ganglios fueron estudiados el día 21. Solo se mencionan datos estadísticamente significativos (p<0,05). Gal-1 y a-VLA suprimieron las fases aferente y eferente de UAE respectivamente. Ambos tratamientos fueron capaces de disminuir el score clínico y la DTH. Los niveles de IL12 no fueron afectados en ningún caso. Gal-1 disminuyó la RP con aumento de IL5, IL10 y disminución de IFN-g. a-VLA indujo aumento de IL18, IL2 e IL10. Cuando aVLA fue administrado en la inducción de UAE se observó aumento de IL18, 10 e IgG2a anti IRBP. Un importante aumento de TGF-b fue observado al utilizar Gal-1 en la fase efectora de UAE. Gal-1 actuaría produciendo apoptosis de linfocitos T uveitogénicos y/o desvío hacia una respuesta tipo T2, en cambio, a-VLA no inhibiría la inducción de células efectoras sino que bloquearía la extravasación de las mismas.

48. Caracterización de inmunoglobulinas artritogénicas en un modelo murino transgénico de artritis reumatoidea. Mariana Maccioni(1), Gabrielle Zeder-Lutz(2), Marc Van Regen Mortel(2), Christophe Benoist(3), Diane Mathis(3).

(1)Depto. Bqca Clínica. Fac. Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba (2)Institut de Biologie Moléculaire and Cellulaire (CNRS) (3)Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston, USA
mailto:mmaccioni@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Severa artritis puede ser inducida en ratones carentes de linfocitos por inyección i.p. de IgG dirigida contra una enzima de localización ubicua: glucosa-6-P isomerasa (GPI). Esta IgG anti-GPI es producida en altos títulos en ratones que desarrollan espontáneamente la enfermedad: los ratones K/BxN. Para estudiar estas inmunoglobulinas artritogénicas, generamos anticuerpos monoclonales anti-GPI (Acs) a partir de células B espontánea-

mente activadas y los inyectamos en receptores apropiados. Aunque una mezcla de 9 Acs anti-GPI indujo severa artritis, ninguno de ellos fue artritogénico cuando se los inyectó en forma individual y a dosis similares. Para determinar la mínima combinación de Acs capaces de generar artritis, las 36 posibles combinaciones de 2 Acs fueron inyectadas; 9/36 combinaciones indujeron artritis. Las combinaciones artritogénicas involucraron Acs de isotipo IgG1, indicando que ese isotipo es capaz de inducir la enfermedad. Con el fin de encontrar las diferencias entre combinaciones artritogénicas y no artritogénicas, se caracterizaron los epitopes reconocidos y la cinética de interacción con GPI usando tecnología de 'surface plasmon resonance'. Las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas de estos Acs fueron secuenciadas y analizadas. Nuestros datos indican que múltiples factores como estabilidad de los inmunocomplejos usados y el epítipo involucrado estarían jugando un rol importante en la capacidad artritogénica de cada combinación.

49. Estudio de los eventos tempranos asociados a la administración por vía oral de colágeno tipo II y quitosano. Carina Porporatto(1), Ismael D. Bianco(2), Clelia M. Riera(1), Silvia G. Correa(1).

(1) *Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC*
(2) *CEPROCOR. Córdoba*
cporporatto@bioclin.fcq.unc.edu.ar

La administración por vía oral de proteínas asociadas a transportadores puede reducir su degradación y promover la absorción en mucosa. Nosotros estudiamos eventos posteriores a la administración de colágeno tipo II asociado al transportador quitosano en una proporción 1:1. Ratas Wistar fueron tratadas con colágeno (C), quitosano (Q), colágeno:quitosano (C:Q) o diluyente (D) y 24 h después se extrajeron placas de Peyer (PP), bazo y nódulos mesentéricos. El número de células/PP estuvo disminuido en los grupos tratados (C, Q y C:Q) con una expresión menor del marcador CD3 estudiado por citometría de flujo en los grupos C o C:Q (C: 32.3%, C:Q 31.8%; $p < 0.05$ vs D). La producción de IL-2 (ELISA) en el sobrenadante de cultivo de PP fue menor en los grupos Q y C:Q ($p < 0.05$), mientras que la IL-10 intracelular estudiada por citometría de flujo estuvo incrementada en los grupos tratados con Q. La viabilidad de las células de PP evaluada in vitro a las 6, 12 y 24 h por actividad de LDH, no se alteró por el agregado de C o C:Q. La presencia de colágeno en bazo de animales tratados con C y C:Q se demostró 24 horas después de la ingesta a través de un ensayo de presentación de antígenos así como la llegada de quitosano-FITC estudiada por citometría de flujo a nódulos mesentéricos y bazo en forma dosis dependiente. La administración de C y C:Q induce eventos tempranos locales y sistémicos similares pero la presencia de Q modula la producción de citoquinas en mucosa.

PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR I

50. Apoptosis y daño genético inducido por idarubicina utilizando oligonucleótidos antisense en la línea celular K-562. Luciano Vellón(1), Marcela B. González Cid(1), Armando L. Karara(2), Ildefonso M. de Campos Nebel(1), María T. Cuello(1), Irene B. Larripa(1).

(1) *Departamento de Genética. Academia Nacional de Medicina* (2) *Unidad de Transferencia Genética. Instituto de Oncología Angel H. Roffo*
lacuteci@intramed.net.ar

La línea celular K-562, portadora del rearrreglo bcr/abl de tipo b3a2 es resistente a la apoptosis inducida por inhibidores de topoisomerasa II. Con el objeto de determinar si el tratamiento con oligonucleótidos antisense (ODNs AS) aumentaba la sensibilidad de esta línea celular al inhibidor de topoisomerasa II idarubicina (IDA), se trataron células de la línea K-562 con complejos de liposomas catiónicos (DCChol-DOPE) y ODNs AS dirigidos contra el ARNm bcr/abl de tipo b3a2, y non sense (ODNs NS) y se

incubaron con IDA 0.5 ug/ml, para inducir apoptosis. La misma se evaluó morfológicamente al microscopio de fluorescencia. En las células tratadas con los conjugados ODN AS/ DCChol-DOPE se observó un mayor porcentaje de apoptosis inducida por IDA ($X \pm DS$: $27\% \pm 1.9$) respecto de los controles no tratados con ODNs ($15.2\% \pm 3.8$) y los tratamientos con ODNs-NS/DCChol-DOPE ($13.8\% \pm 5.9$); ($p < 0.05$) ($n=4$). El ensayo de electroforesis en células individuales (cometa) mostró un porcentaje mayor al 95% de células con un alto daño genético (HDC) en los cultivos tratados con IDA ($n=3$). Por western blot se observó una disminución en los niveles de la proteína p210bcr-abl en los cultivos tratados con los complejos ODN AS/ DCChol-DOPE. Los datos indican que los ODNs-AS dirigidos contra el ARNm bcr-abl de tipo b3a2 disminuyen la expresión de la proteína p210bcr-abl y esto aumenta la respuesta apoptótica de la línea K-562 al daño genético inducido por inhibidores de topoisomerasa II.

51. El Factor Inhibidor de Leucemia (LIF) participa en la involución de la glándula mamaria de ratón. Carolina Schere-Levy(1), Valeria Buggiano(1), Silvia Vanzulli(2), Edith Kordon(1).

(1) *Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires* (2) *Centro de Estudios Oncológicos. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires*

Hemos demostrado previamente que el LIF se expresa en la mama normal del ratón. El objetivo de este trabajo fue analizar la regulación de su expresión y su función en este tejido. Por análisis de Northern blot confirmamos los datos obtenidos por RT-PCR semicuantitativo mostrando que el LIF se expresa en las etapas tempranas de la involución mientras que es prácticamente indetectable en la lactancia. Por estas técnicas también observamos que el bloqueo del flujo de la leche en hembras amamantando resultó en un aumento significativo de la expresión del LIF. Por otra parte, el tratamiento de hembras post-lactancia con hormonas lactogénicas como la hidrocortisona no redujo la expresión del LIF. Para determinar el efecto que induce este factor sobre el epitelio mamario, se implantaron pellets de LIF en mamas de hembras lactando. Por análisis histológico hallamos que las mamas tratadas con LIF presentaban un número significativamente mayor de células apoptóticas (4.03% vs 2.06% , $p=0.004$). Además, por inmunoprecipitación y análisis de Western blot hallamos que este tratamiento inducía la fosforilación de STAT3. Nuestros resultados muestran que la expresión del LIF se induce en etapas tempranas de la involución debido a la liberación de factores locales como consecuencia de la falta de succión de las crías. El LIF participaría en la inducción de apoptosis de células secretorias a través de la activación de la vía de señalización de STAT3.

52. Regulación de la expresión y activación de erbB-1 (EGFR) y erbB-2 en preadipocitos Swiss 3T3L1. Eleonora S. Pagano(1), Juan C. Calvo(2).

(1) *IByME, CONICET, UBA* (2) *IByME y Depto. de Qca. Biológica, FCEyN, UBA*

La expresión de receptores de la familia del EGF en células epiteliales, ha sido intensamente estudiada debido a su rol en la proliferación celular y progresión maligna. Sin embargo, existen muy pocos informes sobre su expresión en células normales y estromales. Previamente demostramos que la línea fibroblástica normal Swiss 3T3L1, que se diferencia a adipocitos, expresa específicamente erbB-2. En este trabajo se estudió la regulación de erbB-2 y del EGFR, durante todo el proceso de diferenciación y su estado de activación (fosforilación). Mediante Western blot demostramos que: a) la línea 3T3L1 expresa abundantemente erbB2, además de las formas conocidas del receptor de EGF; b) esta expresión no muestra cambios significativos durante la diferenciación; c) además de p185 (erbB-2), los inmunoblots revelan otras dos bandas principales, una de 65-70 kDa, presumiblemente herstatina (un producto de splicing alternativo de erbB-2 y también un autoinhibidor) y otra de 35-45 kDa, altamente reguladas

durante la fase proliferativa; d) p185 y p45 son las principales proteínas fosforiladas en tirosina en extractos totales, sugiriendo activación del receptor; e) medios condicionados muestran algunas bandas reactivas, probablemente productos de proteólisis de erbB-2. Esta es la primera evidencia de expresión, regulación y activación de erbB-2 en preadipocitos. El hecho que expresen erbB-2 además de EGF y su receptor, sugiere la posibilidad de heterodimerización entre ambos.

53. Proteínas pro y antiapoptóticas en el proceso de regeneración hepática: Tratamiento con Vitamina C (Vit C). Teresa Ronco(1), María de Luján Alvarez(2), María C. Carrillo(3), Juan A. Monti(3), Gerardo Pisani(4), Cristina Lugano(4), Cristina E. Carnovale(1).

(1)Instituto de Fisiología Experimental (CONICET), Fac Cs. Bioq y Farm. UNR (2)Instituto de Fisiología Experimental (CONICET). Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR (3)Instituto de Fisiología Experimental (CONICET). Fac Cs. Bioq y Farm. UNR (4)Cátedra de Morfología.Fac Cs. Bioq y Farm. UNR mailto:tereronco@hotmail.com

Objetivo: Analizar las modificaciones en los niveles de las proteínas proapoptótica (Bax) y antiapoptótica (Bcl-xL) en el proceso de regeneración hepática posterior al tratamiento con Vit C. Métodos: Ratas Wistar machos adultas fueron divididas en 3 grupos (n=5), Control (vehículo), Vit C 30 mg / kg PC i.p. (C1) y Vit C 100 mg / kg PC i.p.(C2). Cada grupo se subdividió en 2: Sham (Sh) y hepatectomizadas (Hp). Las ratas fueron sacrificadas a las 5 y 24 horas luego de la cirugía. Resultados: En el grupo Control el nivel de la proteína proapoptótica Bax, mostró un aumento significativo del 48% a las 5 horas post cirugía en las ratas Hp respecto de las ratas Sh. (*p<0,05 vs Sh Control). El tratamiento produjo una disminución en los niveles de Bax: Hp-C1 5hs: 30 ± 2%; Hp-C2 5hs: 28 ± 4%* (*p<0,05 vs Hp Control). Se midió el nivel de la proteína antiapoptótica Bcl-xL y se determinó el cociente Bcl-xL/Bax: Hp-Control 5hs: 1,1 ± 0,2; Hp-C1 5hs: 2,0 ± 0,2*; Hp-C2 5hs: 1,8 ± 0,4* (*p<0,05 vs Hp Control). El índice proliferativo (PI) estimado por la detección de PCNA presentó los siguientes aumentos: Hp-Control 24hs: 19,00±2,00, Hp-C1 24hs: 32,20±0,17*, Hp-C2 24hs: 30,50±0,17* (*p<0,05 vs Hp-Control 24hs) y estimado por la técnica de incorporación de 3[H]-Timidina al ADN mostró los mismos incrementos. Conclusión: El tratamiento con Vitamina C disminuye el nivel de apoptosis en las primeras horas de la regeneración hepática, favoreciendo el proceso de proliferación celular

54. TNF-α en células sensibilizadas por estrés osmótico, induce apoptosis por disminución de Bcl-2 y activa NF-κB a través de p38 MAPK. Diana L. Franco(1), Luciana L. Molinero(2), Omar A. Coso(1), Mónica A. Costas(1).

(1)Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEyN - UBA. (2)Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, F Med - UBA. lfranco@bg.fcen.uba.ar

La mayoría de las células son resistentes a la apoptosis inducida por la citoquina pro-inflamatoria TNF-α, pero se sensibilizan cuando se bloquea la síntesis de proteínas, lo cual previene la expresión de genes pro-apoptóticos e inhibe la transcripción de genes anti-apoptóticos inducida por NF-κB. En trabajos previos hemos demostrado que el estrés osmótico sensibiliza a la apoptosis inducida por TNF-α. En el presente trabajo mostramos que en la apoptosis inducida por TNF-α y NaCl hay una disminución de la expresión de Bcl-2 y un aumento de los niveles de actividad transcripcional de NF-κB. También se observó un incremento de la actividad de las quinasas asociadas a estrés JNK, p38 y Erk6. Al inhibir la actividad de la p38 con SB203580 se observó una disminución de la actividad transcripcional de NF-κB y un incremento de la apoptosis, efecto revertido parcialmente al agregar RelA al sistema. Esto sugiere que TNF-α y NaCl no solo disparan la señal de muerte, mediada por disminución de Bcl-2, sino que también gatillan una señal de sobrevida, mediada por

un incremento de la actividad de NF-κB inducido por p38. El balance entre estos dos efectos podría determinar el destino celular a vida o muerte.

COMUNICACIONES EN POSTERS

ENDOCRINOLOGÍA II

55. Lesiones en el páncreas y el riñón de hembras de la línea de ratas diabéticas eSMT de más de un año y su comparación con eSS. Fernando Vignoni(1), Lisandro Vettorello(1), Diego Ogusuku(1), Juan C. Picena(2), Nora S. Figueroa(3), Silvana Montenegro(4), María C. Tarrés(4), Stella M. Martínez(4).

(1)Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas. UNR. (2)Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Ciencias Médicas. UNR (3)Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas. UNR (4)Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas. CIUNR. UNR

mailto:stellamartinez@mcg.org.ar

Trabajos anteriores muestran que los machos eSMT presentan hiperglucemia basal y lesiones pancreáticas y renales más intensas que eSS. El objetivo fue estudiar el riñón y el páncreas en hembras eSMT de más de 12 meses, dada la expresión tardía y morigerada del síndrome diabético en el sexo femenino comparada con hembras eSS de igual edad (n=6 por grupo). En eSMT la glucemia basal (153±6.5 vs 118±6.1; p<0.001) y tras 120 min de sobrecarga glucídica (189±7.3 vs 171±3.7; p<0.05) así como la glucosuria (675±159 vs 134±16.7; p<0.05) (mg/dl) fueron mayores que en eSS. eSMT mostró una población de islotes pancreáticos disminuida respecto de eSS, si bien en ambas líneas hubo pérdida de la arquitectura normal con islotes estrellados y policíclicos. En 3 eSMT se comprobó gemación de islotes a partir de conductos interlobulares, fibrosis interacinar y periductular y focos de hemosiderina. Si bien rara, la presencia de islotes de gran tamaño fue más frecuente en eSMT. En los riñones, ambas líneas mostraron algunos glomérulos disminuidos de tamaño y en ocasiones expansión mesangial entre leve y severa. Los túbulos contenían abundante material proteico; en algunas eSMT se observó vacuolización y tumefacción celular. Ambas líneas mostraron fibrosis e infiltrados linfocitarios intersticiales. Se concluye que las hembras eSS y eSMT de más de un año presentan alteraciones histológicas pancreáticas y renales en relación con el estrés hiperglucémico que son más notables en eSMT.

56. Efecto de una restricción calórica desde edad temprana sobre parámetros del perfil glucolipídico en ratas genéticamente obesas y diabéticas. Marta D. Posadas(1), Veronica Labourdette(1), María C. Gayol(1), Susana A. Calderari(1).

(1) Cat. Biología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Las ratas de la línea Beta presentan una obesidad moderada de instalación peripuberal con hipertrigliceridemia y diabetes en la adultez. Nos propusimos investigar si a través de una restricción calórica implementada desde edad temprana era posible evitar la instalación del cuadro obeso y su posterior complicación diabética. Desde el destete se alimentaron 6 ratas Beta macho con dieta balanceada habitual(T)ad libitum y 10(R)con un 30% menos de lo que consumía el grupo testigo. A los 200 días de edad se obtuvo (media ± error estándar) biomasa (g): T:397.8±13.30vsR:238.2±11.35(***) peso de los panículos adiposos perirrenales y perigonadales(g/100g de peso corporal):T:4.603±0.2785vsR: 3.417±0.2786(**) trigliceridemia(g/l):T:1.85±0.38vsR:0.78±0.08(**) colesterolemia(g/l):T:0.76 ±0.03vsR:1.25 ±0.03(***) glucemia basal (g/l): T: 1.37±0.11 vs R:1.21±0.04(ns) glucemia tras 120 min.de sobrecarga oral con

glucosa (g/l): $T: 1.68 \pm 0.05$ vs $R: 1.45 \pm 0.05$ (**). La restricción calórica del 30% implementada desde el destete, logró evitar en estas ratas genéticamente obesas la instalación del síndrome obeso (ausencia de sobrepeso y disminución significativa de los depósitos grasos) y permitió corregir la hipertrigliceridemia característica de la línea; sin embargo no impidió la evolución del cuadro diabético aunque con valores de glucemia menores para el grupo restringido. En estas ratas la restricción calórica afectó más sensiblemente a la obesidad que al metabolismo de los glúcidos.

57. El ácido gamma-aminobutírico (GABA) como mediador de los efectos del lipopolisacárido bacteriano (LPS) sobre la conducta sexual de la rata hembra. Leonel D. Tesler(1), Mariela E. Fernández(1), Ana V. Sánchez(1), Marina Badaracco(1), Pablo Arias(1).

(1)Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA
mailto:ldtesler@yahoo.com

El LPS induce cambios metabólicos, neuroendócrinos y conductuales a través de la activación del sistema inmune. En la rata hembra, el máximo estado receptivo coincide con el pico de hormona luteinizante resultante de una retroalimentación positiva por parte de los estrógenos. Se ha comprobado que el LPS inhibe este último fenómeno mediante un mecanismo GABAérgico. Objetivos: analizar los efectos de la endotoxina sobre la conducta sexual de la rata hembra y evaluar la participación del ácido gama-aminobutírico (GABA) en los mismos. Métodos: utilizamos ratas de la cepa Wistar ovariectomizadas dos semanas antes del experimento y pretratadas con estradiol/progesterona. Dividimos a los animales en cuatro grupos: 1) control; 2) LPS (500 ug/kg, i.p.); 3) bicuculina (antagonista GABA-A, 400 mg/kg, i.p.) y 4) LPS + bicuculina. De la conducta sexual, estudiamos las fases de preferencia de pareja y de lordosis, mediante el dispositivo de preferencia de pareja de Avistur e Yirmiya. Resultados: el LPS inhibió significativamente la lordosis, lo que se revirtió parcialmente con bicuculina. La preferencia de pareja no se vio afectada. Conclusiones: La inhibición de un paso crucial en la reproducción ante la activación del sistema inmune puede ser interpretada como un mecanismo ecológico. El GABA sería uno de los mediadores de esta respuesta adaptativa.

58. Efectos de la hiperglicemia sobre el sistema renina-angiotensina de ratas diabéticas por aloxano. Verónica V.E. Di Loreto(1), Hilda H. Moreno(1), Rodolfo C. Puche(1), Martha E. Locatto(1).

(1)Facultad de Ciencias Médicas de la U.N.R.
mailto:vediloreto@yahoo.com.ar

Hemos demostrado que las ratas diabéticas por aloxano presentan una disminución en el flujo plasmático renal y en la tasa de filtración glomerular. Estas variaciones están inversamente relacionadas con la glicemia. Se conoce que en la diabetes existen alteraciones en el sistema renina-angiotensina (SRA). El objetivo de este trabajo fue comprobar si la hiperglicemia afecta al SRA contribuyendo a explicar las modificaciones hemodinámicas. Se utilizaron 10 ratas (20-30 días luego de la inducción de la diabetes) con glicemias superiores a 300 mg % (D) y 10 ratas controles (C) de la misma edad. La actividad de renina plasmática (ARP) se midió por RIA a través de la determinación de angiotensina I (Agl) en plasma en condiciones basales y post sobrecarga con glucosa. Los animales diabéticos presentaron disminución significativa en los niveles basales de ARP (C: 86.42 ± 7.99 vs. D: 33.39 ± 4.41 ng/ml/hr, $p < 0.01$), diferencia que persistió luego de la sobrecarga con glucosa. Los niveles plasmáticos de Agl, en ambos casos, mostraron una correlación positiva con los niveles de glicemia (C: $r = 0.79$, D: $r = 0.75$, $p < 0.01$). La sobrecarga de glucosa produjo un incremento en los niveles de Agl que solo fue significativo ($p < 0.0004$, $R^2 = 0.63$) en las diabéticas. Concluimos que las ratas diabéticas por aloxano presentan una disminución en la ARP. La hiperglicemia causaría directa o indirectamente la disminución en la actividad del SRA y condicionaría las alteraciones hemodinámicas observadas.

59. Perfil lipídico y hormonal circulante durante la gestación y lactancia en ratas hipotiroideas. María B. Hapon(1), Silvia M. Varas(2), María S. Gimenez(2), Graciela A. Jahn(1).

(1)Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU-CONICET, Mendoza. (2)Cat. de Biología Molecular, Fac. Qca., Bioqca. y Farmacia, Univ. Nac. San Luis.
mailto:gjahn@lab.cricyt.edu.ar

Mostramos que el hipotiroidismo (hT) crónico inducido por PTU (0.01% en la bebida por 30 a 50 días) altera el contenido y síntesis de lípidos hepáticos y mamarios de ratas preñadas a término pero no en lactancia. A fin de completar el estudio del efecto del hT sobre el metabolismo lipídico y su regulación medimos los niveles circulantes de hormonas (PRL, GH, corticosterona (B)) por RIA, y de lípidos por métodos bioquímicos en ratas, ayunadas por 16 hs, vírgenes (Vi) y en los días 21 de preñez (G21) y 7, 14 y 21 de lactancia (L). En G21 el hT aumentó la PRL (Co: 23 ± 14 ; hT 71 ± 11 ng/ml) y bajó la GH (Co: 22 ± 7 ; hT: 5 ± 1 ng/ml) sin modificarlos en L o en Vi. La B cayó al 50% de los valores controles (Vi Co: 903 ± 174) en todos los casos. El hT aumentó los lípidos totales en Vi (Co: 1.6 ± 0.2 ; hT: 2.4 ± 0.1 g/l), L17 y L21 pero bajó los TGs en G21 (Co: 4.1 ± 0.4 ; hT: 2.5 ± 0.3 g/l), L7 y 14. El colesterol total aumentó entre 20 (en L7) y 100 % (en Vi y L21) aprox. en todos los casos (Vi Co: 0.33 ± 0.02 ; hT 0.63 ± 0.02 g/l) a expensas de aumentos similares en colesterol de LDL + VLDL. La glucemia cayó en Vi (Co 1.05 ± 0.03 ; hT 0.84 ± 0.04 g/l) y en L21, pero aumentó en L7. En G21 los lípidos totales y TGs fueron muy altos con respecto a los demás grupos. Así, el hT produce cambios importantes en los lípidos séricos en Vi, G21 o L, a diferencia de lo que ocurre en tejidos (G21 solamente); estos cambios pueden estar provocados por el hT per se o por los cambios en GH o B.

60. Efecto de la glucosa sobre la reactividad linfocitaria. Participación de los productos de glicosilación. Miriam R. Wald(1), Ana M. Genaro(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)
miriam@cefybo.edu.ar

Se sugirió un paralelismo entre estado diabético e inmunosupresión. Los pacientes con diabetes tienen desregulado el metabolismo de la glucosa con acumulación de productos de glicosilación. Estos interactúan, entre otros tipos celulares, con linfocitos (L). En este trabajo se analizó el efecto de concentraciones crecientes de glucosa (cc glu) sobre la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos. Medios de cultivo con cc glu, producen una disminución, de la proliferación tanto de LT inducidas por Con A (% de inhibición con glucosa (g%) 0.5: 25 ± 3 ; 1: 42 ± 8 ; 2: 68 ± 16 , $n=5$) como LB inducidos por LPS (0.5: 7 ± 3 ; 1: 28 ± 7 ; 2: 71 ± 18 , $n=5$). Este efecto se reproduce al incubar L recién obtenidos con sobrenadantes provenientes de la incubación de L con cc glu (SNc), no observándose dicho efecto con SN incubados en ausencia de L (SNs). Por otra parte, los L preincubados en presencia de cc glu y lavados recuperan su capacidad proliferativa. Es decir, este efecto inhibitorio es mediado por sustancias presentes en el medio de cultivo que interfieren con la respuesta proliferativa. Se comprobó por incubación con 14C-glucosa la presencia de productos de glicosilación en SNc y no en SNs (2g% glucosa, dpm, SNc: 23145 ± 3210 ; SNs 1535 ± 221 , $n=4$). Concluimos que el aumento de glucosa inhibe la proliferación linfocitaria por la formación de productos de glicosilación. Los mismos se formarían a través de la interacción de los L con su medio de cultivo. Financiado por Fundación Roemmers.

61. Análisis histopatológico secuencial del páncreas de ratas macho diabéticas eSMT. Fernando L. Riccillo(1), María I. Bracamonte(2), Silvana Montenegro(3), María C. Tarrés(3), Stella M. Martínez(3), Gloria Cónsole(2).

(1)Cátedra de Histol. y Emb. B - Cátedra de Histol. y Emb. Animal (FCM - FCNyM) UNLP (2)Cátedra de Histol. y Emb.

*B (FCM) UNLP (3) Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas. CIUNR. UNR
mailto: riccillo@atlas.med.unlp.edu.ar*

La rata eSMT desarrolla espontáneamente un síndrome diabético tipo 2, relacionado con un fenotipo obeso moderado, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y niveles de insulina elevados. El objetivo de nuestro trabajo es analizar este modelo, profundizando sobre los cambios histopatológicos del páncreas, en este caso de manera secuencial durante el período de vida de dichos animales. Se utilizaron ratas machos eSMT ($n = 5$) de 2,5,11,14 y 18 meses. Se procesaron los páncreas para microscopía de luz y los cortes (4 μ m) se tiñeron con H y E, tricrómico de Gomori, empleándose técnicas inmunohistoquímicas para la detección de insulina, glucagon y PCNA. El análisis del material evidenció un aumento progresivo de fibrosis intersticial, manifestado a través de la aparición de tabiques conectivos intrainsulares. Como consecuencia de ello, a partir de los 5 meses se observa que los islotes han sido reemplazados por estructuras fragmentarias, compuestas por células o grupos de células endocrinas junto con focos de hiperplasia de células ductales PCNA positivas, acúmulos pigmentarios (lipofucsina) y adiposidad intraglandular. Con la edad, la proporción de células endocrinas disminuye, coincidiendo con el descenso de la insulinemia (34 ± 8 uU/ml (5 meses) vs. 4.02 ± 0.9 uU/ml (18 meses). Así, se evidencia un temprano desarreglo en la histoarquitectura pancreática, ocasionando severas alteraciones que hacen casi imposible la supervivencia de los animales más allá de los 18 meses de edad.

62. Efectos de la denervación hipotalámica por neurotoxina y dieta hiperlipídica sobre la población corticotropa.

Georgina Luna(1), Celia Ferese(1), Gisela Camihort(1), Susana Jurado(1), César Gómez Dumm(1), Eduardo Spinedi(2), Gloria Cónsole(1).

(1)Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. (2)Instituto Multidisciplinario de Biología Celular. mailto:gconsole@atlas.med.unlp.edu.ar

El eje hipotálamo-hipofisario-adrenal-adipocitario regula la conducta alimentaria, a través de los centros de apetito/saciedad. El objetivo del presente trabajo es evaluar la población corticotropa de ratas hembras, con denervación hipotalámica (glutamato monosódico, MSG) y dieta hiperlipídica (DH) durante 120 días. Las hipófisis fueron procesadas para microscopía de luz y se inmunomarcaron mediante un sistema anti- ACTH- EnVision (Dako)- DAB. Se registraron los parámetros estereológicos por medio de un analizador de imágenes (Optimas). El grupo MSG-dieta normal, si bien no mostró diferencias en DV vs sin MSG, desarrolló un aumento significativo ($p < 0.05$) en DC. Este efecto inducido por MSG fue revertido por DH.

ACTH	Dieta normal		Dieta grasa	
	sin MSG	con MSG	sin MSG	con MSG
DVx10-2	2.9 ± 0.4	2.8 ± 0.3	1.7 ± 0.2 *	1.6 ± 0.3 *
DCx10-4	6.9 ± 0.8	11.9 ± 1.3 *	6.7 ± 0.6	7.2 ± 1.0

Concluimos que el MSG induciría hipotrofia-hiperplasia corticotropa, mientras que la DH provocaría hipotrofia-hipoplasia celular, con descenso de DV.

63. Evaluación de la población gonadotropa adenohipofisaria en un modelo experimental de pseudo-obesidad.

Gisela Camihort(1), Georgina Luna(1), Celia Ferese(1), César Gómez Dumm(1), Ricardo S. Calandra(2), Eduardo Spinedi(3), Gloria Cónsole(1).

(1)Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. (2)Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. (3)Instituto Multidisciplinario de Biología Celular. mailto:gconsole@atlas.med.unlp.edu.ar

El glutamato monosódico (MSG) induce daño neuronal hipotalámico con alteraciones neuroendocrinas, obesidad, degeneración óptica e hipogonadismo. La adenohipofisis presenta un aumento de sensibilidad a la GnRH. El presente estudio investiga los cambios inmunohistoquímicos morfométricos en la población gonadotropa adenohipofisaria. Ratas machos fueron sometidas a denervación hipotalámica neonatal (MSG) y dieta hiperlipídica (DH) durante 120 días. Las hipófisis se procesaron para microscopía de luz y se inmunomarcó mediante un sistema anti-FSH/LH-EnVision (Dako)-DAB. Se registraron los parámetros estereológicos por medio de un analizador de imágenes (Optimas). La densidad de volumen (DV) y la densidad de células (DC) presentaron aumento significativo ($p < 0.05$) en los grupos MSG con dieta normal y DH, respecto a controles.

LH	Dieta normal		Dieta hiperlipídica	
	sin MSG	con MSG	sin MSG	con MSG
DVx10-2	4.9 ± 1.9	9.2 ± 1.3 *	4.2 ± 0.6	9.8 ± 1.1 *
DCx10-4	4.7 ± 0.1	14.2 ± 2.9 *	7.1 ± 0.7	27.5 ± 2.6 *

Concluyendo, el tratamiento con MSG-DH ocasiona hipotrofia-hiperplasia celular que determina aumento de DV y DC.

64. La liberación de LH desde pars distalis es modulada por secreciones específicas de pars tuberalis. Martha M.C. Lafarque(1), Liliana B. Oliveros(2), Luis I. Aguado(1).

(1)Laboratorio Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis. 5700 San Luis (2)Laboratorio Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis. 5700 San Luis
mailto:labir@unsl.edu.ar

Anteriormente presentamos evidencias que secreciones específicas de células de Pars Tuberalis (PT) bovina liberan hormona luteinizante (LH) y prolactina (PRL) desde células dispersas de pars distalis (PD) de rata. En este estudio identificamos por gradiente de percoll a la fracción de células responsable del efecto y analizamos sus secreciones por SDS-PAGE 10%. La PT fue disgregada con tripsina 0.25%, luego las células fueron separadas por gradiente de percoll entre 30 y 80% y cultivadas en medio 199 por 48 h. Las células de las fracciones del 50 y 60% secretaron al medio de cultivo un factor(es) que estimuló la liberación de LH desde las células de PD. Cuando esas secreciones se sembraron en SDS-PAGE al 10%, se observó que el eluido de las bandas entre 46 y 66 kDal fue el que estimuló la liberación de LH desde PD (28 ± 2.3 vs 3.2 ± 1.08 ng/ml). A su vez, conociendo que melatonina (M) regula la liberación del factor(es) de PT que libera PRL desde PD, las células de PT se trataron por 24 h con M (0-200 ng/ml). La liberación de LH no mostró cambios. Los resultados obtenidos indicarían que el factor(es) proteico secretado por PT posee un PM entre 46 y 66 kDal y que su acción sobre la liberación de LH desde PD, no sería mediada por M.

65. La estimulación ganglionar con Acetilcolina provoca la liberación de neurotransmisores adrenérgicos en ovario, vía Nervio ovárico superior, de ratas en Diestro. Zulema Z.Y. Sosa(1), Silvia S.M. Delgado(1), Marilina M.N. Casais(1), Ana A.M. Rastrilla(1), Luis I. Aguado(2).

(1)Laboratorio de Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis (2)Laboratorio de Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis.
mailto:labir@unsl.edu.ar

Trabajos previos avalan el concepto que el estado de excitabilidad neuronal en ganglio celíaco (GC), a través del nervio ovárico superior (NOS), estaría en relación con cambios cíclicos en la liberación de esteroides ováricos. Objetivo: investigar los posibles neurotransmisores (NT) liberados en ovario por el NOS, ante el estímulo del GC con Acetilcolina. Se utilizó el sistema in vitro GC-NOS-Ovario, estandarizado previamente, de ratas en Diestro

1 y 2. La acción de acetilcolina 10-6 M sobre GC, se evaluó mediante la liberación de NT adrenérgicos, por HPLC, en el líquido de incubación del ovario (O), a los 120 min. Se determinó Dihidroxifenilalanina (DOPA), Dopamina (DA), Noradrenalina (NA), Adrenalina (A), ácido 3-4 dihidroxifenilacético (DOPAC) y dihidroxifenilglicol (DOPEG). Se realizó Test de Student significancia $p < 0,05$ y los NT se expresaron como pg/ mg O. Resultados: NA: D1(58.1±1.6 vs 37.5±2.1) y D2 (6.32±1vs 6.37±0.6); A: D1(44,21±9 vs 175.14±31.2) y D2 (0.59±0.08 vs 0.92±1); DA: D1(26±5.9 vs 57.6±4) y D2(3.03±0.69 vs 4.96±0.7); DOPA: D1(46.17±3 vs 25.21±3) y D2 (12.3±1.2 vs 3.64±0.4); DOPEG: D1(80.23±9 vs 411.69±57.89) y D2 (8.65±0.1 vs 8.1±2); DOPAC: D1(0 vs 96.16±12) y D2 (7.82±0.7 vs 8.59±0.5). Los resultados indican que la activación neuronal en GC modifica la liberación de NT adrenérgicos en las terminales del NOS. Puede observarse, independientemente de los factores humorales, un efecto neural directo, de naturaleza colinérgica, sobre la fisiología ovárica

66. Efecto de Neuropeptidos sobre la liberación in vitro de Androstenediona ovárica en ratas en Diestro I. Marisa H. Garraza(1), Miguel A. De Bortoli(1), Luis I. Aguado(1).

(1)Laboratorio de biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis
mailto:labir@unsl.edu.ar

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el Neuropeptido Y (NPY), el Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) y la Sustancia P (SP), estudiados individual y simultáneamente con noradrenalina (NA), disminuyen la secreción de Progesterona ovárica de rata in vitro, en diestro I. Objetivo: observar el efecto de los neuropeptidos en iguales condiciones, sobre la liberación in vitro de Androstenediona (An) en ratas en diestro I. Se incubaron los hemiovarios durante 180' en buffer Krebs-Ringer, a 37°C, en baño metabólico en presencia de: ácido ascórbico (Asc) 1mM, NA 10-7 M, NPY, VIP y SP (50 ng/ml c/u), y NA más cada neuropeptido. Se dosó An, por RIA, en muestras extraídas a los 30, 60, 120 y 180'. Se realizó test t de Student comparando los basales con Krebs vs NPY, VIP Y SP, y los basales con Asc vs NA, y NA vs NA más cada neuropeptido. Resultados: (medias±SEM pg/mg de ovario) An basal con Krebs: 30'= 9,27±0,8; 60'= 11,14± 0,9; 120'=12,7±0,9; 180'= 15,94±1,2. Con NPY , An no se modifica. Con VIP se observa disminución de An($p < 0,05$), pero con SP, An aumenta en los tiempos estudiados ($p < 0,05$). An basal con Asc: 30= 8,72±0,6; 60'=10,59±0,8; 120'= 10,99±0,5; 180'= 14,98±0,9. Con NA tiende a disminuir. Con NA +VIP y NA +SP, An aumenta en todos los tiempos ($p < 0,05$). Con NA+NPY, An disminuye a los 30 y 60' ($p < 0,05$). Los resultados sugieren una competencia entre los neuropeptidos utilizados y NA sobre los mecanismos de liberación de An ovárica.

67. Cambios en la inervación del ovario modifican el efecto de las secreciones de esplenocitos sobre la esteroidogénesis ovárica en rata. Myriam L. Forneris(1), Liliana B. Oliveros(1), Luis I. Aguado(1).

(1)Laboratorio Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis. 5700 San Luis
mailto:labir@unsl.edu.ar

Hemos mostrado una interacción neuroinmuno-endocrina entre el ovario (O)-nervio ovárico superior (NOS)-ganglio celíaco (GC)-bazo donde la sección del NOS modifica el número de receptores beta de los esplenocitos (ES). Ahora mostramos, in vivo e in vitro, que la hiperinervación del O modifica a las secreciones de ES, medido a través de su efecto sobre la esteroidogénesis ovárica (pg/mg tejido de progesterona (P), estradiol (E) y androstenediona (A), por RIA). Hemiovarios controles de ratas Holtzman en diestro 2, se incubaron 3h en baño metabólico con líquido de cultivos de ES (LCE) (24 h medio RPMI + 10%FSA y antibióticos) de ratas, I: intactas = controles; II: inyectadas a los 60 d de edad i.m. con valerato de estradiol (2mg) y sacrificadas 2 meses más tarde = ovario hiperinervado (poliquístico, PCO); III:

con PCO y corte de NOS 7 días antes del sacrificio = PCO/NOS. A su vez se midió el efecto de secreciones de ES de ratas PCO/NOS cultivados 24 h con norepinefrina (NE) 10-6 M. El modelo PCO se confirmó por niveles de A, E y P en suero y por histología. Respecto a I, donde $P = 450 \pm 7,3$, $E = 15.1 \pm 0.9$ y $A = 30.2 \pm 1.3$, el LCE del grupo II aumentó P ($p < 0.001$), sin cambio en E y A; LCE del grupo III disminuyó E ($p < 0.001$), sin cambio en P y A. Respecto al grupo III, el LCE PCO/NOS + NE aumentó P y E ($p < 0.025$) y disminuyó A ($p < 0.001$). Vemos así que cambios en la inervación del ovario modifican las secreciones de los esplenocitos, al menos, a través de la vía neural O-NOS-GC-bazo.

HEMATOLOGÍA II

68. Niveles de lipoperoxidación en muestras de sangre entera estabilizada, con y sin el agregado de antioxidantes, durante el almacenamiento prolongado a 4°C. Alejandra Fernández Alberti(1), Nilda E. Fink(1).

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

Durante el almacenamiento a 4°C, los eritrocitos sufren daños oxidativos, acumulándose productos generados por la lipoperoxidación que alteran la estructura de proteínas y enzimas de la membrana. Se estudió la lipoperoxidación, en muestras de sangre entera (SE) por un período de 120 días a 4°C, de SE estabilizada (SEE) con el método de Reardon et al.(1992) y en muestras estabilizadas y adicionadas con Vit.E (0,11; 0,17; 0,23; 0,46 y 0,56µM) y Vit.C (0,68 y 1,36mM). Para ello se midió en 3 lotes por duplicado, cada 10 días, el malondialdehído (MDA), producto de la degradación de hidroperóxidos, según la técnica de Wong et al.(1987). Se midieron además, los niveles de Vit.E por HPLC. Los niveles del MDA en SE, expresados como $X \pm SEM$ en µmol/L plasma, a 1 y 120 días fueron $0,014 \pm 0,003$ y $0,118 \pm 0,029$, mientras que en los demás tratamientos fueron respectivamente $0,052 \pm 0,039$ y $0,112 \pm 0,046$ para la SEE; $0,056 \pm 0,032$ y $0,113 \pm 0,021$ para la SEE+Vit.E 0,56µM; y $0,061 \pm 0,031$ y $0,096 \pm 0,030$ para la SEE+Vit.C 1,36mM. Mediante análisis de varianza, tomando en cuenta los factores tratamiento y experiencia y al día como covariable, se obtuvieron diferencias significativas entre los lotes ($p < 0,001$); al comparar los tratamientos en un mismo lote, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$), salvo entre la SE y los demás tratamientos ($p < 0,0001$). Los antioxidantes adicionados a las concentraciones empleadas no permitieron disminuir significativamente los niveles de lipoperoxidación en 120 días a 4°C

69. Interpretación de los resultados de la prueba del tiempo con veneno de víbora russell diluido (DRVVT) en pacientes bajo anticoagulación oral. Alicia N. Blanco(1), Laura C. Gennari(1), Silvia H. Grosso(1), María A. Lazzari(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina

La detección de inhibidor lúpico (IL) en pacientes (P) bajo anticoagulación oral (AO), se complica por el déficit subyacente. Nos propusimos evaluar diferentes criterios para dRVVT. Determinamos PTTA (Stago) y dRVVT (Sigma), la corrección (P:N) y neutralización con fosfolípidos (FL) de ambos P y P:N. Estudiamos 37 AO: 13 IL+ y 24 IL- (controles) según PTTA; observándose diferencias (pKruskal Wallis < 0,0001) entre ambos, excepto para TP. Criterios dRVVT Valor de corte (>mediacontrol+2DE) No-corrección: A)P:N/N (>1,21), B)(P:N/N)-(P/N) (>1,09), C)(P:N/N)-1)/(P/N) (>0,11); NeutralizaciónP: D)(P/N)-(P/N)FL (>0,17), E)((P/N)-(P/N)FL)/(P/N) (>0,10); NeutralizaciónP:N: F)(P:N/N)-(P:N/N)FL (>0,06), G)((P:N/N)-(P:N/N)FL)/(P:N/N) (>0,06). Obtuvimos mejor sensibilidad/especificidad con A (90/100%) y C (80/100%) (corrección) o F (100/100%) y G (100/100%) (neutralización); la NeutralizaciónP mostró menor sensibilidad/especificidad (D:60/96%; E:50/96%). Observamos 1/24 falsos positivos en D y E, tal

vez por efecto del incremento de FL, en un déficit. El mayor problema fueron los falsos negativos (D:40%; E:50%). La dispersión de valores de NeutralizaciónP en IL- (DDE:0,0885; EDE:5,3390), mayor que para NeutralizaciónP:N (FDE:0,0334; GDE:3,0583), se tradujo en un valor de corte menos acotado, con mayor riesgo de falsos negativos. Creemos que sería de utilidad incorporar la NeutralizaciónP:N, al evaluar la presencia de IL en AO, a fin de mejorar la sensibilidad y especificidad del dRVVT.

70. Análisis de quimerismo mixto empleando microsatélites de alta informatividad. Ariela F. Fundia(1), Carlos D. De Brasi(1), Irene B. Larripa(1).

(1)Depto de Genética, Academia Nacional de Medicina mailto:

El monitoreo de quimerismo mixto con FISH o PCR es una estrategia de diagnóstico rutinaria en pacientes transplantados. Sin embargo, en ciertas patologías es difícil establecer el quimerismo por ausencia de marcadores genéticos específicos. El análisis de microsatélites (STR) ofrece una alternativa rápida y confiable para estudiar quimerismo. A fin de establecer la informatividad de los microsatélites D2S123 (2p16), D7S500 (7q31) y TP53 (17p13.1), se determinó la frecuencia alélica y el porcentaje de heterocigosis en población argentina normal. Se obtuvo ADN de sangre periférica de 40 individuos no relacionados, efectuándose PCR touchdown (disminución de la temperatura de annealing) y gel de poliacrilamida con plata. Se calcularon las heterocigidades (h) observadas y estimadas suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W). Las h observadas para D2S123, D7S500 y TP53 fueron $0,67 \pm 0,16$; $0,80 \pm 0,13$ y $0,68 \pm 0,16$; mientras que las esperadas fueron $0,90 \pm 0,07$; $0,77 \pm 0,10$ y $0,85 \pm 0,08$, respectivamente. Estos valores indican que los STR analizados son altamente informativos en la población argentina. Se hicieron diluciones de productos de PCR de 2 controles en diferentes proporciones (0-100%), obteniéndose una sensibilidad de quimerismo de 5 a 10%. Si bien este método no alcanza la sensibilidad del FISH/PCR, proporciona un alto rango de discriminación alélica y sería muy útil para el seguimiento de pacientes transplantados con donante del mismo sexo o sin marcadores genéticos específicos.

71. Importancia de la utilización de reactivos de diferente sensibilidad en el estudio del inhibidor lúpico (IL). Laura C. Gennari(1), Alicia N. Blanco(1), Silvia H. Grosso(1), Patricia Casais(1), María A. Lazzari(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina mailto:blanco@hematologia.anm.edu.ar

En la detección del IL es importante la utilización de reactivos de alta sensibilidad; más aún si se asocia a otro/s defecto/s de la coagulación, como en pacientes bajo anticoagulación oral (AO). Nos propusimos analizar el diferente comportamiento de reactivos de APTT según su sensibilidad y la posibilidad de utilizar como prueba confirmatoria la diferente respuesta entre reactivos de alta y baja sensibilidad, comparándola con el APTTPNP (prueba confirmatoria). Estudiamos 41 AO: 16 IL+ (criterios SSC-ISTH, según dRVVT) y 25 IL- (control). Se utilizaron 2 reactivos de APTT, uno de alta sensibilidad (A:PTTLA; Stago) y otro de baja sensibilidad (B:APTTL; Grifols). Los resultados de A y B, correlacionaron entre sí tanto en IL+ como en IL-, mostrando diferencias significativas entre ambos ($p < 0,001$). La media de APTT fue mayor en IL+ que en IL- tanto para A (IL+: $100,06 \pm 25,30$; IL-: $60,52 \pm 12,97$; $p < 0,001$) como para B (IL+: $47,78 \pm 8,07$; IL-: $42,92 \pm 5,06$; $p = 0,014$), siendo mayor la significación estadística para A. Para expresar la diferente respuesta obtenida con A y B elegimos la relación (A-B)/B, estableciendo como corte, valores $> 0,6513$ (media + DS). El (A-B)/B mostró una sensibilidad (87.5%) y especificidad (92%) similar al APTTPNP (S=87.5%, E=96%) para detectar IL. Vemos entonces la importancia de la utilización de 2 reactivos de diferente sensibilidad, el de alta como screening y su relación con el de baja sensibilidad para evidenciar el efecto dependiente de fosfolípidos.

72. Análisis de fosfatasa alcalina ósea y deoxipiridinolina y su correlación con beta2 microglobulina en pacientes con Gamapatía monoclonal de Significado Indeterminado y Mieloma Múltiple. Estela L. Motta(1), Eduardo G. Horacek(1), Mirta Olivera(1), Alejandro Dates(1), Aura Perozzi(1).

(1)Hospital Interzonal «Dr. Oscar Alende» Mar del Plata

El objetivo de este estudio es evaluar la posible asociación entre la actividad de la enfermedad, medida a través de la beta2microglobulina sérica y los niveles de los marcadores de formación y resorción ósea en pacientes con GMSI y MM. Se analizaron muestras de orina y suero en 17 pacientes con MM y en 5 pacientes con GMSI. Los pacientes con Mieloma Múltiple activo (n = 9) tuvieron valores medios de deoxipiridinolina / creatinuria de $14,5 \text{ nmol/mmol}$ y fosfatasa alcalina ósea de $22,8 \text{ U/l}$ con beta2microglobulina promedio de 10467 ng/ml ; mientras aquellos con MM no activo tuvieron valores promedio de deoxipiridinolina / creatinuria de $7,93 \text{ nmol/mmol}$, fosfatasa alcalina ósea de $29,7 \text{ U/l}$, y beta2microglobulina de 2529 ng/ml . Los valores promedio de deoxipiridinolina / creatinuria, fosfatasa alcalina ósea y beta2microglobulina en los pacientes con GMSI fueron $11,21 \text{ nmol/mmol}$, $20,5 \text{ U/l}$ y 2475 ng/ml respectivamente. La correlación entre el marcador de resorción ósea y la beta2microglobulina en los pacientes con GMSI, MM no activo y MM activo fue $r_s = 0$, $r_s = 0,90$ y $r_s = 0,15$ respectivamente; calculados con el coeficiente de correlación lineal de Spearman. Esto sugiere una importante correlación entre la deoxipiridinolina urinaria y el marcador de actividad de la enfermedad en los pacientes con MM no activo a diferencia de aquellos pacientes con mieloma activo. No se observó correlación entre los marcadores estudiados en el caso de pacientes con GMSI.

73. Albúmina glicosilada: acción sobre la inducción de óxido nítrico. Ana L. Ortalli(1), Noemí L. Zanaro(1), Susana M. Ouviaña(1), Beatriz Sassetti(1).

(1)Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA mailto:ortalli@qb.fcen.uba.ar

En pacientes diabéticos, se ha descrito la formación de productos de glicosilación de proteínas (AGEs). Para esclarecer, en parte, los eventos que conducen a las complicaciones crónicas, se estudió la acción de la albúmina glicosilada (AGE-BSA) en ratones macho Balb/c de entre 8 y 12 semanas de edad. Un grupo (A, n=5), fue inoculado con 600 microgramos (mcg) de AGE-BSA y un grupo control (C, n=5) con 600 mcg de BSA, dos inyecciones por semana durante un mes. Se determinaron los niveles séricos de glucosa (G), insulina (I) y HbA1c en sangre heparinizada obtenida por punción cardiaca. Los macrófagos obtenidos por lavado peritoneal fueron cultivados 24 horas y luego estimulados con LPS. En los sobrenadantes se midieron nitritos con el reactivo de Griess. En las células se determinó la inducción de óxido nítrico sintetasa (iNOS) utilizando un anticuerpo específico. Los sobrenadantes de cultivos del grupo A mostraron niveles de nitritos aumentados respecto de los C: $36,9 \pm 2,2$ vs $11,5 \pm 1,8 \text{ mcM}$. HbA1c(%): $14,3 \pm 4,8$ vs $9,3 \pm 0,2$. I (UI/ml): $8,7 \pm 2,3$ vs $5,0 \pm 1,0$ ($p < 0,05$). G (g/l): $0,7 \pm 0,3$ vs $0,6 \pm 0,3$. Las células provenientes del grupo A fueron positivas para la expresión de iNOS y las C negativas. Luego, niveles altos de AGEs producen aumento de HbA1c e I, con regulación de G. Además contribuyen a la inducción de iNOS y a altos niveles de óxido nítrico y su eventual combinación con radicales oxigenados puede ser parte del mecanismo que conduce a la microangiopatía diabética.

74. Acción de la albúmina glicosilada sobre el endotelio vascular y otros tejidos murinos. Ana L. Ortalli(1), Beatriz Sassetti(1).

(1)Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA mailto: sassetti@qb.fcen.uba.ar

La hiperglucemia prolongada puede dar lugar a productos avanzados de glicosilación final (AGEs). Se estudió la acción de la albúmina glicosilada (AGE-BSA) sobre el endotelio vascular, pulmones, riñones e hígado en ratones tratando de evaluar en parte, los mecanismos de producción de la disfunción endotelial que conducen a la microangiopatía diabética. Se utilizaron ratones macho Balb/c entre 8 y 12 semanas de edad. Grupo A (n=5) se inocularon por vía intraperitoneal con 600 microgramos (mcg) de AGE-BSA, grupo B (n=5) con 300 mcg de AGE-BSA y grupo C (n=5) con 600 mcg de albúmina sin tratar (BSA), dos veces por semana durante un mes. 72 horas después de la última inoculación se sacrificaron los animales e inmediatamente se procedió a la extracción y fijación de los órganos. Se realizaron cortes histológicos de 5mcm de espesor de grandes vasos, hígado, pulmón y riñón. Se tiñeron con eosina-hematoxilina, para evaluar estructuras y con ácido periódico-Schiff (PAS) para evidenciar estructuras glicosiladas. Se observaron grandes aumentos de depósitos glicosilados en las paredes vasculares, en pulmones y riñones. Mayores alteraciones correspondieron a mayores niveles de AGE-BSA. Ninguna alteración fue observada en el grupo control. Concluimos que los AGE-BSA pueden conducir en forma dosis dependiente a la formación de lesiones endoteliales y tisulares irreversibles.

75. Aumento de la actividad proteolítica plasmática en pacientes sépticos. María B. Di Carlo(1), Daniel N. Bustos(1), María F. Bustos(2), Carlos Sosa(3), Electra Moreno(4), Miguel A. Chaves Z.(4), Alicia J. Klecha(5), María C. Carmona(6), Viviana M. Yapur(6), Miguel Jorge(7), Gustavo A. Negri(6).

(1)Lab.Gast.y Enz.Clinica - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA (2)Lab.Gast.y Enz.Clinica - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA (3)UCI - Hospital de Clinicas - UBA (4)UCI - Hospital de Clinicas - UBA (5)Lab. de Radioisotopos -Facultad de Farmacia y Bioquímica -UBA (6)Lab.Gast.y Enz.Clinica -Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA (7)UCI - Hospital de Clinicas -UBA
mailto:mbdicarlo@dbc.fyb.uba.ar

La AP es el resultado de la interacción de la actividad de las proteasas y sus inhibidores. En condiciones inflamatorias, la liberación de enzimas proteolíticas del neutrófilo podría llevar a un desbalance en el sistema proteasa - antiproteasa(P-AP) con el consiguiente incremento en la AP. Este incremento podría contribuir a la injuria observada en el paciente séptico. Para estudiar un posible desbalance P-AP en pacientes sépticos, se determinó AP, alfa1antitripsina (AAT), alfa-2 macroglobulina (A2M), interleukina 6 (IL-6) y Proteína C reactiva (PCR) en el suero de pacientes que presentaron diferentes estadios del proceso séptico: sepsis severa y shock séptico. Se estudiaron 46 pacientes: 18 sepsis severa y 28 shock séptico, definidos según los criterios A.C.C.P./S.C.C.M., comparando los resultados obtenidos con los de un grupo control (n=20). Los resultados obtenidos mostraron en los pacientes sépticos un aumento significativo (p<0.01) de: AP, AAT, IL-6 y PCR y una disminución significativa (p<0.01) de A2M, con respecto a los controles. En los pacientes con shock séptico se observó un aumento significativo en la AP y IL-6 (p<0.001) en comparación con sepsis severa, no observándose variaciones significativas en las concentraciones de AAT, A2M y PCR. Por los datos obtenidos podemos concluir que uno de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el daño producido durante el proceso séptico podría deberse a una AP exacerbada, que podría deberse a un desbalance proteasa antiproteasa

76. Efectos del pH en el espectro de absorbancia de hemoglobina y metahemoglobina en eritrocitos humanos (HE). Rut Agüero(1), Inés Demaría(1), Adriana Silvestro(1), Amalia Videla(1).

(1)Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario
mailto:raguero@citynet.net.ar

El pH intracelular (pHi) puede alterarse en diversas condiciones patológicas. Se ha observado cambio en la magnitud de la absorbancia de hemoglobina (Hb) intraeritrocitaria y libre a longitudes de onda fija frente a modificaciones del pH extracelular (pHe) de HE. En este estudio se reevaluó dicho cambio y la influencia de la metahemoglobinización. Dos fracciones de HE obtenidos por punción venosa de cinco donantes voluntarios ocasionales, una de ellas previamente metahemoglobinizada en medio NaNO₂ (156 mM) (MHE), fueron lavadas e incubadas durante 50 min en medios HEPES-NMG (HENMG y MHENMG) o HEPES-Na⁺ (HENA⁺ y MHENA⁺) con nistatina y cuyos pHe oscilaron entre 6,3 y 7,6. Se efectuaron barridos de espectro de absorbancia (600-400 nm) por duplicado de las suspensiones de HE y MHE en los medios respectivos (Hcto. final 0,015%) y de sus correspondientes lisados (LHENA⁺, LHENMG, LMHENA⁺ y LMHENMG). Se identificaron 2 picos espectrales a pH 7,4 en LHENA⁺ y LHENMG (nm): 414, 432 y en LMHENA⁺ y LMHENMG: 406, 421. Ambos picos se desplazaron con cambios del pHe (corr. p>0,05). En HE y MHE se destacó un pico a 419 nm para HENA⁺ y HENMG y a 410 nm para MHENA⁺ y MHENMG. Los picos se desplazaron con cambios del pHe (corr. p>0,05) en medios NMG. Además de un ligero aplanamiento y desplazamiento del primer pico, los cambios espectrales observados en HE coinciden con los de Hb libre y no dependen de la oxigenación de la misma. El sodio podría alterar el equilibrio entre el pHi y pHe en HE.

INMUNOLOGÍA III

77. Influencia del envejecimiento sobre el desarrollo de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Yanina Ditamo(1), Alicia L. Degano(1), Daniela R. Macció(1), German A. Roth(1).

(1)Depto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba
mailto:yditamo@dqf.fcq.unc.edu.ar

La EAE es un modelo de enfermedad autoinmune desmielinizante del SNC. En animales jóvenes (45-50 días de edad) el período agudo de la enfermedad ocurre a los 15 días post-inducción (dpi) y comprende parálisis de las patas posteriores, disminución del peso corporal y de los niveles de proteína básica de mielina (PBM), sulfátidos y actividad de CNPasa del SNC, aparición de infiltrados mononucleares e inducción de anticuerpos y células T anti-PBM. Teniendo en cuenta la interrelación entre los sistemas inmune y neuroendócrino, en el presente estudio se analizó el efecto del envejecimiento sobre el desarrollo de la EAE. En ratas de más de 12 meses de edad no se observó el síntoma de parálisis característico, sólo una disminución creciente del peso corporal, perdurable durante todo el período de estudio (40 dpi). CNPasa, PBM y sulfátidos disminuyeron cuantitativamente en forma similar a lo observado en jóvenes pero a partir de 22 dpi. Sin embargo, a los 15 dpi ya se observa una respuesta inmune humoral anti-PBM que aumenta con el tiempo siendo máxima a los 40 dpi. El análisis de los subtipos de IgG indica que estos anticuerpos son principalmente IgG2a e IgG2b. En cambio la respuesta celular anti-PBM se observa desde los 15 a los 40 dpi en forma constante. Estos resultados indican que los cambios de las funciones inmunes que ocurren durante el envejecimiento modularían la expresión de la EAE produciendo alteraciones más leves que en animales jóvenes pero perdurables en el tiempo.

78. Efecto de la testosterona sobre el desarrollo de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Daniela R. Macció(1), Yanina Ditamo(1), Alicia L. Degano(1), German A. Roth(1).

(1)Depto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba
maccio@dqf.fcq.unc.edu.ar

Considerando la interrelación entre los sistemas nervioso, endócrino e inmunológico se evaluó la participación de hormonas

gonadales en la regulación de la EAE. Se examinó la respuesta inmune a proteínas encefalitogénicas y el curso clínico de la EAE, inducida por inyección de mielina en AFC, en ratas machos normales, castradas o suplementadas con testosterona. Los animales normales presentaron los signos característicos de la enfermedad a los 11-12 dpi y se recuperaron a los 18 dpi, mientras que en los castrados persistieron hasta los 30 dpi mostrando más de un pico de enfermedad. En animales suplementados los síntomas clínicos aparecieron más temprano y el período agudo fue más prolongado y severo comparado con animales normales y castrados. No se encontró variación en la incidencia de la enfermedad entre los distintos grupos de animales. La respuesta humoral anti-PBM y anti-PLP fue similar en todos los grupos de animales con EAE; sin embargo, los suplementados presentaron además, una marcada respuesta contra proteínas de mielina de alto peso molecular. La proliferación de linfocitos T en presencia de PBM en animales normales fue observada entre los 15 y 28 dpi. Los animales suplementados presentaron una elevada respuesta sólo a los 14 dpi mientras que en los castrados la proliferación aumentó con el tiempo, observándose aún a los 35 dpi. Los resultados indican que un desbalance en los niveles de testosterona alteraría los mecanismos autoinmunes efectores y/o regulatorios.

79. Participación de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los glucocorticoides (GC) en la patogénesis del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) experimental. Sonia Gómez(1), Gabriela C. Fernández(2), Fernanda Alves Rosa(2), Graciela Dran(2), Carolina J. Rubel(2), Martín A. Isturiz(2), Marina S. Palermo(2).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas. A. Nacional de Medicina. (2)Investigaciones Hematológicas. A. Nacional de Medicina.
gomez1015@yahoo.com.ar

La respuesta inflamatoria modula la toxicidad de la toxina shiga (Stx), y a través de ello el desarrollo del SUH. Mientras se sugiere que los PMN contribuyen al daño endotelial, nosotros demostramos que los GC endógenos protegen. El objetivo de este trabajo fue analizar en un modelo murino de SUH los mecanismos involucrados en la protección por GC. Para ello medimos los niveles plasmáticos de las citoquinas TNF- α e IL-1 β en respuesta a una dosis letal 50 (DL50) de Stx2, en animales controles, adrenalectomizados, ó tratados con RU486, antagonista del receptor para GC (R-GC). No hubo diferencias entre grupos a las 2, 24, 48 y 72 hs post-Stx2. Para analizar la relevancia de los PMN en el modelo, estudiamos la toxicidad de Stx2 en ratones controles y neutropénicos (NP) por inoculación de anticuerpos de conejo anti-PMN. Se encontró en los ratones NP una menor sensibilidad a Stx2 (%Sobrevivida: controles= 20%; NP= 60%; n=30/grupo; p<0.05). Ya que la acción de los GC dependen de la expresión de sus receptores en las células efectoras, se evaluó por citometría el número de R-GC en los PMN de ratones inoculados con sc fisiol ó Stx2. Se vió un aumento significativo a las 24 hs luego de la inyección con Stx2 (aumento en la IMF/ sc fisiol: Stx2= 3.42 + 0.66; n=4, p<0.05). Concluimos que los PMN son fundamentales en la patogénesis del SUH. Además, la Stx induce la expresión de R-GC en los PMN, sugiriendo que la protección por GC podría deberse, al menos en parte a su modulación funcional

80. Efectos maternos sobre la susceptibilidad a desarrollar asma en los hijos en un modelo murino de sensibilización por vía aérea. Alejandra Goldman(1), Yasue Suzuki(2), Kaoru Hamada(2), Lester Kobzik(2).

(1)Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de General San Martín (2)Department of Environmental Health, Harvard School of Public Health
mailto:alejandragoldman@hotmail.com

La patogénesis del asma refleja la influencia de varios factores: susceptibilidad genética, infecciones, y factores ambientales. Desarrollamos un modelo murino a fin de estudiar los efectos del

asma materno sobre el desarrollo de asma en la cría dado que epidemiológicamente se lo identificó como un importante y poco estudiado factor de riesgo. Se generaron hembras BALB/c asmáticas por sensibilización con OVA las que fueron apareadas y desafiadas (as/ova) o no (as/-) durante la preñez. La cría fue evaluada luego de su sensibilización y desafío por vía aérea con OVA. La cría de asm/ova desarrollo una respuesta exacerbada de las vías aéreas -medida con un plentismógrafo de cuerpo entero- mientras que la de normales y de as/-, no. Penh con 50mg/ml de metalcolina: 2.4 \pm 0.23 vs 0.9 \pm 0.05 y 1.25 \pm 0.06; p<0.01, n=8. El cambio fisiológico fue acompañado por un aumento en el porcentaje y número de eosinófilos (x104) en lavado broncoalveolar: 1.8 \pm 0.8 vs 0.45 \pm 0.15 y 0.4 \pm 0.2 (p<0.05, n=8) y en los niveles de IgEantiOVA medidos por ELISA: 0.13 \pm 0.08 vs 0.01 \pm 0.01 y 0.01 \pm 0.005 (p<0.05, n=8) (índice respecto del control positivo). La histopatología de los pulmones del grupo proveniente de as/ova mostró infiltración perivascular y peribronquial de células inflamatorias. Los resultados obtenidos muestran que, en este modelo, es necesaria la exposición de la madre asmática al alérgeno durante la preñez para desarrollar asma en los hijos.

81. Aumento de timocitos CD8b+ acompañan la recuperación de la involución tímica en ratas desnutridas durante la lactancia. Catalina Feledi(1), Hebe L. Goldman(1), Liliana G. Franco(1), María E. Roux(2), Ernesto J. Massouh(1).

(1)Inmunología, Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (2)Inmunología Celular, Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica
emassouh@qb.fcen.uba.ar

Las ratas desnutridas durante la lactancia por duplicación de camada son inmunodeficientes. Sus Timos se estudiaron entre 21 y 120 días de edad. Se observó el característico bajo peso del órgano al destete, con recuperación gradual. Histológicamente, la estructura cortico-medular estaba bien conservada, aunque con un relativo aumento del área medular en animales post-puberales, siendo los espacios perivasculares normales. Los estadios de maduración de los timocitos se caracterizaron analizando los antígenos de superficie CD4 y CD8 por citometría de flujo. La proporción de timocitos dobles negativos (DN: CD4-CD8-), origen de los DP, está aumentada entre los 21 y 28 días de edad (%N21=2.3 \pm 0.07 vs %D21=6.95 \pm 0.7, p=0.02). La proporción de timocitos dobles positivos (DP: CD4+CD8+), origen de los simples positivos SP, está disminuida entre los 21 y 50 días de edad (%N21=83.6 \pm 0.42 vs %D21=66.1 \pm 1.3, p=0.0006). La proporción de timocitos SP CD4+ es normal o ligeramente disminuida (p=0.11), pero la proporción y número absoluto de los SP CD8+ está aumentada desde el destete en adelante (p=0.02), y #N50= 29.8 vs #D50=82.4). La relación #CD4+/#CD8+ está siempre por debajo de la normal en los D (N=4-2 vs D=0.6-0.8). La acumulación de timocitos DN y disminución de los DP indica un retraso en la maduración. El aumento observado de CD8+ no resulta de la infiltración del órgano por células de la periferia, sino que podría deberse a alteraciones en la regulación de la selección.

82. Interacción entre glucocorticoides (GC) y citoquinas en la regulación de la expresión de factores de transcripción (FT) involucrados en el fenotipo del linfocito T helper (Th). Ana L. Liberman(1), Damián R. Refojo(1), Eduardo Arzt(1).

(1)Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. FCEyN. UBA.
mailto:Liberman@bg.fcen.uba.ar

Se ha demostrado recientemente que el FT GATA-3 es selectivamente expresado en células Th2 y el FT T-bet en células Th1, y que su expresión en linfocitos es clave para la adquisición de los fenotipos Th1 o Th2. Los GC inhiben las respuestas inflamatorias por transrepresión de los FT AP1 y NF κ B, y la activación de los linfocitos Th0 por inhibición de los factores AP1 y NFAT esenciales para la expresión de IL-2. Si bien se ha obser-

vado que bajo ciertas condiciones los GC pueden llevar al fenotipo Th2, no se conoce aún su acción sobre los factores específicos Th1/Th2. En este trabajo estudiamos la regulación de estos FT por GC. Demostramos que los GC (Dexametasona 10⁻⁸ M e Hidrocortisona 10⁻⁶ M) inhiben la expresión del RNAm (3.4 kb) de GATA-3 (63 % relativizado por actina) y del RNAm (~ 2.4 kb) de T-bet (84 % relativizado por actina). Resulta interesante que la inhibición de T-bet es mayor y que el tratamiento con GC no extingue la expresión de GATA-3 posiblemente debido a que para que esto ocurra deben estar presentes IL-12 e INF γ . La inhibición de los GC sobre GATA-3 es revertida por IL-4 (5 U/ml) que señala vía STAT-6 para activar la expresión de GATA-3. También observamos que la inhibición de T-bet es antagonizada por el agregado de IL-12 (10 U/ml) que señala vía STAT-4 para activar la expresión de T-bet. La exposición aguda a GC induce la inhibición de los FT específicos Th1 y Th2, acción antagonizada por las citoquinas que inducen dichos fenotipos.

83. Alteraciones de la respuesta inmune inducida por el estrés crónico. Participación de las hormonas tiroideas y de la corticosterona. Magalí D. Silberman(1), Miriam R. Wald(1), Ana M. Genaro(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)
genaro@cefybo.edu.ar

Numerosas evidencias indican que el estrés crónico produce cambios inmunológicos mediados por alteraciones neuroquímicas y/u hormonales. En el presente trabajo analizamos el efecto del estrés crónico sobre la respuesta proliferativa y su correlación con los niveles séricos de hormonas tiroideas y corticosterona. A tal fin ratones BALB/c fueron expuestos a un modelo de estrés crónico (CMS) de 1 a 6 semanas. A partir de la 4ta semana de CMS observamos una disminución en la respuesta proliferativa de linfocitos T inducida por concanavalina A (dpm, control(C): 208310 \pm 31247 vs CMS: 99989 \pm 15002, n=5). Contrariamente, la respuesta de linfocitos B frente a LPS fue mayor (C: 75625 \pm 11343 vs CMS: 121000 \pm 18153, n=5). En paralelo, encontramos una disminución en los niveles de hormonas tiroideas (T3 (ng/dl) C: 78.5 \pm 3.2 vs CMS: 67.3 \pm 4.4; T4(ug/dl) C: 4.53 \pm 0.21 vs CMS: 3.88 \pm 0.36, n=8). Los niveles de corticosterona se incrementaron tras 1 o 2 semanas de exposición al CMS (2da semana, (ng/ml), C: 170 \pm 15 ; CMS: 413 \pm 32, n=8) y luego se normalizaron. Bajos niveles de hormonas tiroideas inducidas por tratamiento con propiltiouracilo afectaron la respuesta de linfocitos T pero no de B. El tratamiento con dosis terapéuticas de T4 de ratones expuestos al CMS normalizaron la respuesta proliferativa T sin modificar la B. En su conjunto estos resultados indican que el estrés crónico modificaría la función tiroidea afectando la respuesta inmune mediada por linfocitos T.

84. Estimulación de la proliferación linfocitaria normal y tumoral por hormonas tiroideas (HT). Participación de proteína quinasa C (PKC) y óxido nítrico sintasa (NOS). María L. Barreiro Arcos(1), Gabriela Gorelik(1), Alicia J. Klecha(1), Graciela A. Cremaschi(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-CONICET
mailto:grace@cefybo.edu.ar

Previamente demostramos un perfil diferencial de PKC y alta actividad de NOS en células del linfoma T murino BW5147 (BW), respecto de linfocitos T normales (LTN). También se comprobó la regulación de la respuesta inmune por HT. En este trabajo estudiamos los efectos de HT sobre la actividad linfocitaria normal y tumoral. Las HT ejercieron una estimulación dosis-dependiente de la proliferación celular medida por incorporación de [3H]-timidina, tanto de LTN inducidos mitogénicamente (índice de estimulación en ausencia de hormonas: 109 \pm 9 vs T3 (10⁻⁷ M): 163 \pm 13 ó T4 (10⁻⁵ M): 175 \pm 15, p<0.05), como de células BW (mismas dosis de T3 y T4 indujeron un incremento de la proliferación basal del 64.0 \pm 5.8% y 96.5 \pm 9.3%, p<0.05, respectivamen-

te). Ambas HT fueron incapaces de modificar el perfil isoenzimático de PKC, realizado por westernblot, pero la T4 (10⁻⁵ M) incrementó la expresión de la isoforma atípica z en células BW (unidades densitométricas arbitrarias: basal, 4.8; T4, 7.2). Asimismo en células BW, pero no en LTN, la T4 incrementó la actividad de NOS, determinada por formación de 14C-Citrulina (basal: 104.3 \pm 8.5 vs T4: 171.1 \pm 10.8 pmol/10⁷ cel, p<0.01). Concluimos que las HT modulan la actividad linfocitaria normal y tumoral sin involucrar modificaciones en la distribución de isoformas de PKC. Sin embargo el aumento de PKC z juntamente con el incremento de la actividad de NOS en las células tumorales indicarían un efecto diferencial de las HT sobre ambos tipos celulares.

85. La estimulación β -adrenérgica (β A) induce la activación de óxido nítrico sintasa (NOS) mediante la activación de proteína quinasa C (PKC) en una línea celular de linfoma T. Gabriela Gorelik(1), María L. Barreiro Arcos(1), Alicia J. Klecha(1), Graciela A. Cremaschi(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-CONICET
mailto:grace@cefybo.edu.ar

Previamente describimos una disminuida expresión de receptores β adrenérgicos (R β A), desacoplados a la adenilato ciclasa, pero acoplados a la activación de PKC en células del linfoma T murino BW5147 (BW). Con el fin de verificar la participación de otros caminos intracelulares, estudiamos la actividad de NOS en estas células y su modulación por el agonista β A isoproterenol (ISO). Encontramos una alta actividad de NOS (determinada por formación de 14C-Citrulina) en las células BW, que fue bloqueada por staurosporina (STAU), GF109203X (GF), L-NAME y aminoguanidina (AG) (Basal: 97.8 \pm 9.3 vs STAU: 41.0 \pm 4.2; GF: 37.1 \pm 3.5; L-NAME: 15.3 \pm 1.8 ó AG: 23.7 \pm 2.6 pmol/10⁷cel, p<0.01). Por western blot se encontró expresión de la isoforma calcio-independiente, NOS II, no detectable por incubación en presencia de STAU. El ISO indujo un incremento de la actividad de NOS (Basal: 86.9 \pm 8.7 vs. ISO (10⁻⁵M): 167.6 \pm 13.1, p<0.01), bloqueable por el antagonista β A, propranolol (PROP) y el β 2-selectivo, butoxamina (BUTOX) (% de inhibición: PROP: 86.1 \pm 7.3; BUTOX: 63.1 \pm 5.4). Dado que la estimulación β A por ISO induce la traslocación de PKC, podemos concluir que la activación de NOS por el agonista β A involucraría a la isoforma II y sería mediada por PKC. Estos resultados sugerirían que los R β A se acoplan a señales intracelulares que regulan positivamente la actividad de las células del linfoma T BW a diferencia de lo descrito en linfocitos T normales. Financiado por Ministerio de Salud de la Nación.

86. Relación entre citoquinas th2 y muerte celular. estudio en vellosoidad intestinal de ratas wistar en un modelo de inmunodeficiencia secundaria. Sofía Olmos(1), Cecilia A. Frecha(1), María E. Roux(1).

(1)Lab. de Inm. Cel., Dep. Cs. Biol. Fac. Farm y Bqca, UBA

Se demostró en ratas Wistar que sufrieron deprivación proteica severa al destete perdiendo 25% del peso inicial y luego recibieron dieta de caseína al 20% (grupo R21) aumento de linfocitos intraepiteliales intestinales (LIEi) TNF α que coexpresan TCR $\gamma\delta$ y CD8 α , sugiriendo un proceso inflamatorio no histológicamente observable. La administración oral del inmunomodulador Timomodulina (TmB) durante la renutrición (R21TmB) revierte estos hallazgos (Scand. J. Immunol. 54, 2001). El objetivo de este estudio fue analizar el mecanismo mediante el cual actúa el TmB: ¿es por la producción de citoquinas TH2 (IL-10), o los LIEi aumentados en R21 sufren un proceso apoptótico, o ambos mecanismos intervienen en la reversión del proceso inflamatorio?. La población IL10+ se determinó por inmunofluorescencia indirecta en secciones de intestino. La muerte celular (fragmentación del ADN) se determinó por TUNEL. Resultados : Nº de células en 30 campos, X \pm ES, n=10: a) IL-10: C60 (control)vsR21vs R21TmB:29.5 \pm 2.3vs 16.8 \pm 2.1vs24.4 \pm 1.4, p 0.0007; ANOVA,

Tukey-Kramer. b) Muerte Celular: C60vsR21: 8.5 ± 1.0 vs 15.1 ± 2.1 , $p < 0.05$; C60vsR21TmB: 8.5 ± 1.0 vs 8.0 ± 1.6 , $p > 0.05$, ANOVA, Dunnet Multiple Comparison test. Conclusiones: el TmB: 1) induce disminución de células TNF α acompañada por aumento de células IL-10+; 2) existe una disminución significativa de la muerte celular no habiendo diferencias entre R21TmB y C60; 3) nuestros resultados indican que el TmB actúa por ambos mecanismos propuestos. CONICET, UBA

87. Aparición temprana de TNF- α , IL-6 e IL-10 en tejido linfoido asociado a bronquios (balt) en ratas wistar en crecimiento. Cecilia A. Frecha(1), Sofía Olmos(1), María E. Roux(1).

(1)Lab. De Inmunol. Cel., Dep. de Cs. Biol, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.
mailto:cfrecha@ffyb.uba.ar

Estudios previos en el desarrollo de células inmunocompetentes en BALT de ratas Wistar han demostrado que al aparecer los primeros BALUs (4 días de edad) se detectan mayoritariamente células T gd+. El objetivo de este trabajo fue estudiar en BALT la aparición de células productoras de citoquinas: TNF- α , IL-6 e IL-10. Se usaron animales de 4, 12, 21 y 60 días de edad. Cortes histológicos del tracto respiratorio inferior (5 n) se procesaron por la técnica de Saint Marie y estudiaron por Inmunofluorescencia Indirecta. Se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo contra cada citoquina, revelándose con (Fab)² de cabra conjugado con FITC anti IgG de conejo. Resultados: Número absoluto de células, $X \pm ES$, $n=5$; Tuckey Kramer o Test de Student Lamina Propia: 1) TNF α e IL-6: 4vs12vs21, pNS; 2) TNF α : 21vs60 $p < 0.05$; 3) IL-6: 21vs60 $p < 0.0003$; 4) IL-10: 4vs12vs21 $p < 0.0001$; 21vs60 pNS. Se observó la siguiente relación entre el número de células T TNF α + e IL-10+(TNF α /IL-10): 4d=2.06; 12d=1.52; 21d= 0.81 y 60d= 0.87. Conclusiones: 1) En BALT se observó la aparición temprana de células productoras de citoquinas. 2) A los 4 días de edad la relación TNF α /IL-10 está aumentada significativamente, invirtiéndose al día 21. 3) La aparición de TNF α a los 4 días de edad coincide con la existencia de células gd+ (Dev. Comp. Immunol 2000,24:683-389), ya que éstas pueden producir TNF α . 4) Los valores de citoquinas Th2 (IL-6 e IL-10) a los 4 y 12 días concuerdan con la escasez de células B IgA+. CONICET4147, UBA TB072

88. Efecto de Lactobacillus casei y yogur adicionado a una dieta de renutrición sobre linfocitos de mucosa intestinal. Paola Gauffin Cano(1), Gabriela Perdígón(2).

(1)Centro de Referencia para Lactobacilos, Tucumán, Argentina (2)Cat de Inmunología, Fac de Bioqca, UNT. Centro de Referencia para Lactobacilos, Tucumán, Argentina
mailto:pgauffin@cerela.org.ar

Una de las consecuencias de la desnutrición es la involución tímica. Objetivos: Estudiar la influencia de dosis óptimas de Lactobacillus casei (Lc) y yogur (Yo) adicionados a una dieta de renutrición(Re) sobre: LB; maduración de LT y expresión del TCR. Métodos: A ratones Balb/c desnutridos por déficit proteico(D) y renutridos durante 7d (Re7d) y 14 d (Re14d) se les adicionó por 5 d Lc 10×10^7 cel/ml o Yo diluido al $\frac{1}{2}$ (Yo $\frac{1}{2}$). Sobre cortes histológicos de intestino delgado se determinó por IFD: LB IgA+ e IgG+; LT CD3+, CD4+, CD8+ y TCR a/b o g/d (cels fluorescente/10cpos100x); y se evaluó histología del timo. Resultados: la Re aumenta el nº de cels IgA+ próximo al control no desnutrido(ND); Lc y Yo no producen efectos significativos sobre LB (ND=86 \pm 3; D=44 \pm 3; Re7d=80 \pm 3; Re14d=95 \pm 1). No se observó incremento de LB IgG+. Lc y Yo indujeron un incremento de LT CD3+ en Re7d (ND=56 \pm 1; D=15 \pm 1; Re7d=26 \pm 4; Yo $\frac{1}{2}$ =45 \pm 2; Lc=46 \pm 5); de CD4+ (ND=49 \pm 4; D=20 \pm 3; Re7d=21 \pm 4; Yo $\frac{1}{2}$ =39 \pm 5; Lc=33 \pm 6); y de CD8+ (ND=37 \pm 5; D=18 \pm 1; Re7d=19 \pm 3; Yo $\frac{1}{2}$ =31 \pm 3; Lc=29 \pm 3). En Re7d, Lc y Yo favorecen la expresión del TCRg/d (ND=43 \pm 3; D=19 \pm 2; Re7d=15 \pm 3; Yo $\frac{1}{2}$ =37 \pm 6; Lc=37 \pm 3) pero no de a/b. Conclusiones: el aumento de IgA+ y no de IgG+ indica un aumento de la RI de mucosa pero no inflamatoria. La maduración

de LT fue acorde con la recuperación histológica del timo. El aumento de cels TCR g/d en estadios tempranos de Re influenciados por probióticos, favorecería la protección frente a enteropatógenos durante la recuperación inmune.

89. Inmunobiología del envejecimiento: Sistema inmune asociado a mucosas. Diego O. Alignani(1), Miriam V. Liscovsky(1), Belkys A. Maletto(1), Andrea S. Rópolo(1), María C. Pistoresi(1).

(1)Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.
mailto:dalignani@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Las mucosas representan uno de los principales sitios de entrada de los patógenos al organismo, por lo tanto una eficiente respuesta inmune inducida por esta vía es de gran importancia y más aún en individuos envejecidos, quienes presentan cambios en el sistema inmune que los hacen más susceptibles a las infecciones. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune sistémica en ratones BALB/c envejecidos (18 meses de edad) cuando OVA (1 mg/dosis/animal) fue administrada por vía oral utilizando como adyuvantes CpG oligodeoxinucleótidos no metilados (CpG) (50ug/dosis/animal) comparado con Toxina colérica (TC) (10ug/dosis/animal). Resultados: se observaron niveles similares de IgG e IgA (anti-OVA) en suero en ratones inmunizados con OVA-TC y OVA-CpG; mayores niveles de INF γ en bazo (1.205 pg/ml) y placas de Peyer (1.596pg/ml) en ratones inmunes a OVA-CpG que en los inmunes a OVA-TC (873 pg/ml y 651 pg/ml respectivamente), mientras que en los inmunes a OVA-TC observamos liberación de IL-5 en bazo (279 pg/ml) a diferencia del grupo OVA-CpG (no detectable). Por FACS se observó en células mononucleares de bazo un aumento similar de células CD19+ en ambos grupos experimentales (52% en OVA-CpG y 49% en OVA-TC) respecto a animales normales de 18 meses (28%). Conclusiones: CpG (adyuvante TH1) induce en animales envejecidos (perfil TH2) similar respuesta inmune humoral sistémica a la inducida por TC.

90. Estudio de la Respuesta Inmune inducida por Antígenos Timo-Independientes (T-I) en animales envejecidos. Carolina L. Montes(1), Belkys A. Maletto(1), Andrea S. Rópolo(1), María C. Pistoresi(1).

(1)Dpto de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Univ. Nacional de Córdoba
cmontes@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Durante el envejecimiento se observa un deterioro de la respuesta inmune humoral y celular. Para evaluar la respuesta hacia antígenos T-I en animales envejecidos, células B normales (CB) de animales de 18 meses (CBV) y de 3 meses (jóvenes) (CBJ) fueron estimuladas con anti-u (10ug/ml) y la respuesta proliferativa evaluada 48 hs post-cultivo. CBV presentan un incremento en la respuesta proliferativa (103959 \pm 4487cpm) comparada con la de las CBJ (69825 \pm 6398cpm). LPS indujo una respuesta comparable en ambos grupos. El análisis de marcadores de activación demostró que CBV, estimuladas con anti-u por 48 hs, presentan un aumento de células CD19+B7.2+ (85% vs 70% en CBJ). La expresión de moléculas clase II no mostró diferencias en ambos grupos a este tiempo. El análisis por FACS con yoduro de propidio, 18hs post-cultivo, reveló que CBV presentan menos apoptosis espontánea que las CBJ (40% vs 52%). Cuando CBV fueron estimuladas con anti-u a distintos tiempos observamos una disminución de la apoptosis 24 hs (14%) y 48 hs (33%) post-cultivo comparada con CBJ 24hs (20%) y 48hs (51%). Por Western blot observamos que CBV estimuladas con anti-u no presentan aumento en los niveles de BCLxL comparado con las CBJ indicando que otra molécula anti-apoptótica estaría operando en este fenómeno. Los resultados indican que CBV tienen mayor capacidad de activarse y proliferar y que presentan menor grado de apoptosis frente a estímulos mediados por el BCR.

91. Estudio de la proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1) en un modelo de orquitis autoinmune. Vanesa A. Guazzone(1), Claudia Rival(1), Berta Denduchis(1), Livia Lustig(1).

(1)Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina, UBA
mailto:ciruba@fmed.uba.ar

La orquitis autoinmune experimental (OAE), inducida en la rata por inmunización activa con antígenos espermáticos y adyuvantes, se inicia con un incremento en el número de células linfomononucleares en el intersticio del testículo. El objetivo del trabajo fue determinar si la proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1) está involucrada en la atracción de dichas células al órgano blanco. Se cuantificó, por ELISA, la concentración de MCP-1 en: fluido testicular (F), medio condicionado de macrófagos (M) y suero de ratas controles (C) y con OAE. Se detectó una mayor concentración de MCP-1 en F y M de ratas con OAE vs C: F: $81,51 \pm 12,85$ vs $35,52 \pm 5,63$ ($p=0,028$), M: $13,25 \pm 3,60$ vs $0,241 \pm 0,241$ ($p=0,002$). Por técnicas de inmunoperoxidasa se determinó la expresión de MCP-1 y su receptor CCR2 en cortes de testículo obtenidos en criostato. Una mayor intensidad en el producto de reacción fue observada en: endotelio, células mononucleares, células de Leydig y células de Sertoli de las ratas con OAE en relación a las del grupo C en las cuales no existe un infiltrado linfomononuclear. CCR2 se detectó en las células linfomononucleares de la luz de los vasos y del intersticio. El número de células CCR2+ en las ratas con OAE fue tres veces mayor que en las del grupo C. Los datos sugieren que MCP-1 y CCR2 están involucrados en el reclutamiento de linfocitos y monocitos intersticiales durante el desarrollo de la OAE.

92. Expresión de IL-6 y de su receptor en el testículo de ratas con orquitis autoinmune experimental. Claudia Rival(1), Susana Theas(1), Olga M. Suescun(2), Livia Lustig(1).

(1)Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina. UBA (2)Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; Instituto de Biología y Medicina Experimental; IMBICE
mailto:ciruba@fmed.uba.ar

Resultados previos sugieren que en la orquitis autoinmune experimental (OAE) factores liberados por linfocitos y macrófagos estarían involucrados en el daño del epitelio germinal. Nos propusimos estudiar en el testículo de ratas con OAE la presencia de interleuquina-6 (IL-6), una de las citoquinas pro-inflamatorias. Para ello analizamos la histopatología testicular, la expresión de IL-6 y de su receptor (IL-6R) por inmunohistoquímica y la presencia de IL-6 en el medio condicionado de macrófagos (MCM) testiculares. La OAE se indujo en ratas por inmunización activa con antígenos espermáticos y adyuvantes (grupo E) y los animales fueron sacrificados a distintos tiempos. Se detectó IL-6 y IL-6R en macrófagos y células de Leydig de ratas del grupo E y controles (C). IL-6R fue a su vez, localizado en las células germinales y dicha expresión aumentó significativamente en las ratas del grupo E a partir del período en que la lesión testicular es severa (más de 70 días) (0-30 días (d): C: $1,5 \pm 1,9$ vs E: $2,5 \pm 2,1$; 50-60d: C: $16,2 \pm 8,8$ vs E: $10,8 \pm 10,7$; 70-110d: C: $4,5 \pm 5,0$ vs E: $344,7 \pm 149,5$; >110d: C: $1,1 \pm 1,2$ vs E: $272,5 \pm 58,1$; * $p < 0,01$). La concentración de IL-6 (pg/ml) determinada por ELISA fue significativamente mayor en el MCM de ratas del grupo E respecto del MCM de ratas del grupo C (C: $70,4 \pm 6,5$ vs E: $398,3 \pm 153,5$; $p < 0,01$). Los resultados sugieren que en la OAE la IL-6 liberada por los macrófagos estaría involucrada en la inducción de la lesión del epitelio germinal.

93. La estimulación de linfocitos T por anticuerpos anti-CD28 y PMA induce la expresión de Galectina-1 dimérica a través de vías intracelulares dependientes de MEK1/ERK y p70S6 quinasa. Mercedes B. Fuertes(1), Luciana L. Molinero(1), Natalia Rubinstein(1), Marta A. Toscano(1), Leonardo Fainboim(1), Norberto W. Zwirner(1), Gabriel A. Rabinovich(1).

(1)Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. UBA
narubinstein@hotmail.com

Galectina-1 (Gal-1), proteína con propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias específicas, se expresa en macrófagos, células epiteliales tímicas y linfocitos T activados. Recientemente, se determinó que Gal-1 producida por células T activadas actúa en forma autócrina inhibiendo la activación y proliferación linfocitaria. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos que regulan la expresión de esta proteína. El objetivo del presente estudio fue investigar los estímulos que modulan la expresión de Gal-1 en linfocitos T y estudiar las señales intracelulares involucradas en este fenómeno. Por ensayos de Western blot observamos que la activación de linfocitos de sangre periférica por 3 días con AcMo anti-CD28 y PMA, fue capaz de inducir la expresión de Gal-1. Con el fin de explorar las señales intracelulares involucradas en dicha expresión, se estimularon linfocitos T con AcMo anti-CD28 y PMA, bloqueando farmacológicamente: a) la vía de MEK1/ERK utilizando U0126; b) la vía p38 MAPK con SB202190; c) la vía calcineurina/NFAT utilizando ciclosporina A y FK506 y d) la vía p70S6 quinasa con rapamicina. Se observó inhibición significativa de la expresión de Gal-1 dimérica al bloquear las vías intracelulares dependientes de MEK1/ERK y p70S6quinasa. El presente estudio constituye la primera evidencia acerca de las señales intracelulares que regulan la expresión de Gal-1, cuya importancia es crucial en la homeostasis de la respuesta inmune bajo condiciones fisiológicas y patológicas.

NEUROCIENCIAS I

94. Perímetro, superficie y forma del cuerpo calloso en imágenes de resonancia magnética. Relaciones con el sexo, la edad y el tamaño del cerebro. Alicia B. Merlo(1), Eduardo F. Albanese(2), Adolfo G. Saubidet(3), Elena E. Gómez(1), Adriana V. Ingrassia(1), Jorge H. Miño(2), Tomás A. Mascitti(4), Alfonso M. Albanese(5).

(1)Fac. de Medicina. USAL (2)Fac. de Medicina. USAL Fac de Farmacia y Bioquímica. UBA (3)Hospital Francés (4)Fac de Medicina. UBA (5)Fac de Medicina. USAL
mailto:uds-medi@salvador.edu.ar

Introducción: Pocos trabajos hacen referencia al perímetro del cuerpo calloso (cc) en el plano sagital medio y los que estudian su superficie no son concluyentes sobre la influencia de edad y sexo. Objetivos: Determinar perímetro y superficie del cc y establecer relaciones entre dichos valores y el sexo, tamaño cerebral y edad (rango 15-82 años y sub-rangos). Material y Método: En imágenes de resonancia magnética digitalizadas, se midió mediante el programa Scion Image for Windows perímetro y superficie del cc en el plano sagital medio y superficies cerebrales parasagittales de 194 sujetos normales de ambos sexos. Los resultados se procesaron estadísticamente (ANOVA y correlación (r) de Pearson entre los valores obtenidos y la edad). Resultados: En sujetos femeninos y masculinos, significativamente, entre 15 y 40 años, la superficie aumenta (r: 0.33 y 0.60) y, después de los 60 años disminuye (r: -0.72 y -0.78); no se modifica en los rangos de 15 a 82 y de 41 a 60 años. Entre 15 y 82 años el perímetro aumenta leve y significativamente (r: 0.22 y 0.35). Solamente en relación al tamaño del cerebro la superficie es mayor en la mujer. Discusión: El trabajo aporta valores de perímetro y superficie del cc, los que varían significativamente con la edad pero no con el sexo. La relación entre ambos indica variaciones de la forma del cc con la edad. Se evidencia que si sólo se analizan amplios rangos de edades pueden obtenerse falsas conclusiones.

95. Efectos en la motivación exploratoria por activación de receptores histaminérgicos del núcleo accumbens y la amígdala en la rata. Edgardo O. Alvarez(1), Arturo M. Banzan(1).

(1) *JUNEFECO, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.*
mailto: ealvarez@fmed2.uncu.edu.ar

Se ha descrito la participación de neuronas histaminérgicas de la Amígdala (AMG) en la expresión de conductas exploratorias en la rata. En este trabajo se analizó el efecto de la activación simultánea de neuronas histaminérgicas de AMG y el núcleo accumbens (ACC) en este perfil de motivación exploratoria. Para ello, se usaron ratas macho adultas que se implantaron simultáneamente en AMG y en ACC con cánulas de microinyección. 72 horas después distintos grupos de animales fueron inyectados con 9 nmol simultáneamente en AMG y ACC (n=18, combinación '+'); salino en ACC e histamina en AMG (n=14, combinación '-+') e histamina en ACC y salino en AMG (n=13, combinación '+-'). Otros grupos con la misma combinación se usaron para las dosis 45 nmol (n=20, '+'); n=14, '-+'; n=13, '+-') y 90 nmol (n=14, '+'); n=13, '-+'; n=13, '+-'). Salina en AMG y en ACC se consideró control. 5 min más tarde los animales se evaluaron por 5 min en el Laberinto en Cruz Elevado Asímetríco como modelo de motivación exploratoria. Los resultados mostraron que en bajas dosis la estimulación unitaria con histamina de AMG o de ACC fue efectiva en inhibir la motivación exploratoria del brazo 'Sin Pared', considerado el más conflictivo (9.1 ± 1.4 s Vs 2.6 ± 1 s; grupo '++' Vs '-+', $p < 0.01$). No hubo diferencias en la exploración del mismo brazo o de los otros a dosis más altas. Los resultados sugieren una interacción funcional entre las neuronas histaminérgicas del ACC y AMG en la motivación exploratoria.

96. Un tratamiento hipóxico de corta duración disminuye el máximo número de sitios de unión de [3H]MK-801 en el complejo receptor NMDA. Marina Vacotto(1), Diego J. Rodríguez Gil(1), Alba Mitridate de Novara(1), Sara Fiszer de Plazas(1).

(1) *Instituto de Biología Celular y Neurociencias*
mvacotto@yahoo.com

La exposición del SNC a condiciones hipóxicas produce cambios en la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria. El objetivo del presente trabajo ha sido establecer el perfil ontogenético del receptor NMDA y analizar en diferentes días del desarrollo embrionario (DE) 12 al 18, las variaciones que produce una hipoxia hipóxica aguda normobárica (O₂ al 8%, por 60 min.) en dicho complejo receptor. A tal fin, se realizaron ensayos de unión de [3H]MK-801, a una fracción de membranas sinápticas aisladas de lóbulos ópticos de pollo. La caracterización ontogenética reveló un pico máximo de unión en el DE12, el cual desciende hasta alcanzar los valores del adulto. Los ensayos de saturación realizados en los DE 12 y 18 de animales controles, demuestran la presencia de sitios de unión de alta y baja afinidad para el [3H]MK-801. En los estadios analizados, el tratamiento hipóxico produjo una disminución significativa del máximo número de sitios de unión (B_{max}) de los sitios de baja afinidad de un 48 % y 28% respectivamente (C12: 2.63 ± 0.36 , H12: 1.27 ± 0.29 y C18: 4.11 ± 0.06 , H18: 2.95 ± 0.12 pmol/mg prot., $P < 0.05$), sin variaciones significativas en la constante de disociación (K_d). Sin embargo, esta injuria no alteró ni la K_d ni el B_{max} de la población de receptores de alta afinidad. En conclusión, el tratamiento hipóxico produce una reducción del B_{max} de baja afinidad para MK-801 en el receptor NMDA. Esto podría deberse a cambios post traduccionales, endocitosis, o a muerte celular.

97. Acerca de la astrocitosis espontánea y de su componente proliferativo en curso del envejecimiento. María C. Vanzani(1), Roberto L. Caccuri(1), Rubén F. Iacono(2), Angel Alonso(1), María I. Berría(1).

(1) *Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina-UBA* (2) *IDEHU-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA*

mailto:titivanzani@hotmail.com.

Si bien el envejecimiento astrocitario implica un gradual incremento de células espontáneamente diferenciadas con concomitante caída de su potencial de división, existe gran variabilidad en la información a ese respecto. Se imponía entonces la necesidad de un análisis cuantitativo en muestras obtenidas en forma seriada para su posterior procesamiento simultáneo. En consecuencia, se cosecharon entonces encéfalos de ratas desde las 24 horas de vida hasta el año de edad para su doble marcación inmunocitoquímica, primero de GFAP (proteína gliofibrilar ácida) y luego de PCNA (antígeno nuclear de célula proliferante). En base al conteo de células inmuno-reativas en 16 áreas de corteza cerebral frontotemporal elegidas al azar, el número de astrocitos diferenciados (GFAP+) aumentaba significativamente, tanto en las capas superficiales (2.2 ± 1.9 a las 24 horas; 15.8 ± 4.8 a los 6 meses; y 19.5 ± 3.2 al año), como en las profundas (3.0 ± 2.1 ; 20.9 ± 4.8 ; y 17.3 ± 3.3 , respectivamente). En los referidos astrocitos con citoplasma GFAP+, el porcentaje de aquellos con marcación en núcleo (PCNA+) fue 48, 16, y 4 en capas superficiales y 35, 11 y 0 en las profundas. De los resultados obtenidos, cabe concluir que el potencial proliferativo astrocitario que en las ratas adultas se evidenciaba uniformemente, en los animales ancianos quedaba limitado a la astrogliosis de las capas superficiales, con la consiguiente restricción de una efectiva respuesta glial a la eventual injuria celular.

98. Modulación de la actividad del núcleo subtalámico por los núcleos del rafe. Juan E. Belforte(1), Jorge H. Pazo(1).

(1) *Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Laboratorio de Neurofisiología. U.B.A.*
mailto: jpazo@fmed.uba.ar

El núcleo subtalámico recibe una rica inervación serotoninérgica desde los núcleos del rafe principalmente del dorsal, cuya acción sobre el mismo no es bien conocida. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de esas aferencias sobre la función motora del subtalámico y los posibles receptores involucrados. Los experimentos se realizaron en ratas ambulantes implantadas unilateralmente con cánulas guías en el núcleo subtalámico. La administración de 5HT intrasubtalámica produce rotaciones contralaterales, dosis-dependientes. El mayor efecto se obtuvo con las dosis de 2,5 a 10 mg / 0,2 ml ($P < 0.02$, NK después de ANOVA, $n = 48$). La máxima actividad rotatoria se obtuvo 4 min. después de la inyección. El solvente no posee efecto. Esta acción de la 5HT es suprimida por la co-administración del antagonista miaserina y por la lesión previa del núcleo subtalámico. La administración de dosis equimolares de agonistas específicos para los receptores 5HT₃ (quipazine y mCFG), producen un acción similar a la 5HT pero con efecto mayor del primero (80 vs 21.2 rotaciones netas/h, $P < 0.001$). La inyección intracerebral del agonista 5HT_{2C}, MK212, induce rotaciones contralaterales en magnitud similar al mCFG. De lo anterior deducimos que las aferencias serotoninérgicas al subtalámico, producen un efecto inhibitorio sobre el mismo, ya que inducen movimientos contralaterales, característicos de la desfacilitación de la SNR y del núcleo entopeduncular.

99. Estudio preliminar sobre la sensibilidad y confiabilidad del modelo matemático de dipolos (D) para la localización de la zona epileptógena (ZE) en epilepsias parciales (EP). Walter Silva(1), Javier Roitman(2), Damián Consalvo(3), Brenda Giagante(4), Carlos D'Attellis(5), Silvia Kochen(6).

(1) *Centro de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía. CONICET. UBA* (2) *Centro de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía. UTN. Universidad Favaloro.* (3) *Centro de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía. CONICET. UBA. FEMIEN.* (4) *Centro de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía. UBA* (5) *Universidad Favaloro.* (6) *Centro de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía. CONICET. UBA.*

mailto:whsilva@logos.com.ar#D:\Datos Inscripción.mdb#

Diferentes métodos de localización de dipolos (D) han sido utilizados para identificar generadores de actividad paroxística interictal (API). Otros han demostrado su utilidad para mejorar la definición de la zona epileptógena (ZE). El objetivo fue evaluar la confiabilidad y sensibilidad de este método comparado con el análisis visual del EEG y la correlación clínica de las crisis (Video-EEG). Seleccionamos 60 segmentos de EEG con API, cada uno de 0.6 seg. Los EEG seleccionados pertenecen a 3 p. en los que se pudo establecer con certeza la ZE por Video-EEG. Las API fueron promediadas y analizadas empleando el modelo de D múltiples espacio-temporales implementado en el programa BESA. Los resultados fueron proyectados sobre la IRM cerebral. La sensibilidad fue evaluada comparando los resultados obtenidos luego de promediar 3, 10 y 20 API. Para determinar la confiabilidad, se verificó la estabilidad de la ubicación y orientación final de cada D frente al cambio de las condiciones iniciales de cálculo. Los diferentes resultados fueron comparados con la ZE establecida por Video-EEG. En el 100% de los pacientes, se estableció una buena correlación entre la ubicación del D principal y la ubicación de la ZE. La máxima sensibilidad fue alcanzada al utilizar 20 API. La solución del D principal resultó confiable frente a las diferentes condiciones iniciales. En este análisis preliminar el método del D resultó útil para ayudar a definir la ZE en las EP.

- 100. Alteraciones extrahipocampales de la intensidad de señal en Resonancia Magnética en pacientes con esclerosis hipocampal.** Mariana Bendersky(1), Damián Consalvo(2), Carlos Rugilo(3), Silvia Oddo(4), Brenda Giagante(5), Walter Silva(4), Salomón Muchnik(6), Silvia Kochen(4).

(1)Centro de Epilepsia- Hospital Ramos Mejía- UBACYT-III Cátedra de Anatomía Normal, Medicina, UBA (2)Centro de Epilepsia- Hospital Ramos Mejía- Fundación FEMIENT-CONICET (3)Fundación FEMIENT (4)Centro de Epilepsia- Hospital Ramos Mejía- CONICET (5)Centro de Epilepsia- Hospital Ramos Mejía- (6)UBACYT- Facultad de Medicina, UBA
mailto:mbendersky@intramed.net.ar

La Esclerosis Hipocampal (EH) causa frecuentemente epilepsia refractaria, y en general tiene tratamiento quirúrgico. El hallazgo de señales hiperintensas del hipocampo (H) en las secuencias FLAIR de RM fundamentan el diagnóstico. Hipótesis: La EH afectaría otras áreas límbicas-paralímbicas además del H. Objetivo: Detectar estas alteraciones utilizando RM. Metodología: 15 pacientes (p) con EH y 22 sujetos control (c) fueron estudiados con FLAIR. Las intensidades de señal (IS) se midieron en las siguientes cortezas: H, entorrinal, ínsula anterior, y posterior, cíngulo, septal y orbitofrontal. Comparamos cada área en ambos hemisferios en cada grupo (test t) y los datos de los p contra los c (Z score), y correlacionamos la IS de cortezas extrahipocampales de un hemisferio con el H ipsilateral. El intervalo de confianza fue 95%. Resultados: No encontramos diferencias entre ambos hemisferios en los c, mientras que los p mostraron asimetrías significativas ($p < 0.05$) en casi todas las cortezas estudiadas. Considerando la corteza del H, encontramos 3 grupos, siempre asimétricos: IS anormal unilateral ($z > 2$ DS); IS normal bilateral; IS anormal bilateral. 46.66% de los p presentaron IS anormales en una o más cortezas extrahipocampales. Hubo correlación entre la IS del H esclerótico y las anomalías extrahipocampales (Coef. Corr > 0.70). Conclusiones: En los p con EH, el H es la estructura más afectada. En 46.66% de nuestros p, el resto del sistema límbico estaba también afectado.

- 101. Análisis de los tests de memoria luego de la lobectomía temporal en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal.** Silvia Oddo(1), Patricia Solís(2), Damián Consalvo(1), Walter Silva(1), Brenda Giagante(2), Patricia Saldón(2), Silvia Kochen(1).

(1)Hospital Ramos Mejía. CONICET (2)Hospital Ramos Mejía
mailto:silviaoddo@hotmail.com

La evaluación neuropsicológica (NPS) en los pacientes (p.) con epilepsia del lóbulo temporal candidatos a cirugía permite valorar las funciones cognitivas, lateraliza y localiza la zona epileptógena (ZE) y predice los posibles déficit postoperatorios. Se analizaron los resultados de los tests de memoria, luego de una lobectomía temporal. Se realizaron tests de inteligencia, memoria verbal y visual. Los p. fueron evaluados 6 meses luego de la cirugía y se compararon estos resultados con los preoperatorios. Los resultados de los tests fueron comparados con la población normal y se consideraron anormales cuando se encontraban 2 DE por debajo de la normativa. En los casos donde ambas memorias eran anormales, se utilizó el test de Z para comparar ambas muestras. Se incluyeron 17 p. 16 p. mostraron déficit de memoria. Los resultados post-quirúrgicos fueron: 11 p. con déficit de memoria verbal, 8 (72.7%) presentaban la (ZE) en el hipocampo izquierdo y 3 (27.3%) en el derecho. 9 p. (81.8%), no presentaron cambios y 2 p. (18.2%) con ZE a izquierda mejoraron. De los 5 p. con déficit visual, 4 p. (80%) tenían la ZE en el hipocampo derecho y 1 (20%) en el izquierdo. 3 p. (60%) sin cambios y 2 p. (40%) con ZE a derecha, mejoraron. Se obtuvo una correlación memoria material-específico y ZE en un 75 % de los p. Ningún p. mostró empeoramientos en los tests postoperatorios. Los resultados obtenidos demostraron ser de gran valor en la localización de la ZE y en el pronóstico post cirugía.

- 102. Lateralidad de pie y mano su correlación en diestros, ambidiestros y zurdos.** Adriana V. Ingratta(1), Eduardo F. Albanese(2), Alicia B. Merlo(3), Elena E. Gómez(3), Emiliano A. Gloazzo(3), Jorge H. Miño(4), Alfonso M. Albanese(5), Anton E. Coleman(3).

(1)Fac. de Medicina, USAL, Hospital P. Elizalde (2)Fac. de Medicina, USAL, Fac. de Farmacia y Bioquímica UBA (3)Fac. de Medicina, USAL (4)Fac. de Medicina, USAL, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA. (5)Fac. de Medicina, UBA.
mailto:uds-medi@salvador.edu.ar

Según Lorin y Bryden (1998) la lateralidad de pie más que la de mano reflejaría con mayor precisión la dominancia cerebral del lenguaje. El objetivo del trabajo fue comparar los scores de lateralidad de mano y de pie, considerando ambidexidad scores entre +33 y -33 (escala de 100 a -100). Se administraron a alumnos universitarios (360 femeninos y 122 masculinos) para lateralidad de mano el test de Edimburgo-Oldfield (E)(1971), el test CAAM (Congreso Argentino de Neurociencias; 1998) y un test de pie con 10 items. Estos dos últimos tests fueron diseñados por nuestro grupo. Los coeficientes de correlación de Spearman (rS) entre scores de pie y mano (E y CAAM) fueron: para ambidiestros de pie femeninos 0.46 y 0.51 ($p < 0.01$), masculinos 0.38 y 0.39 ($p < 0.01$); para zurdos de pie la correlación no fue significativa y para diestros de pie sólo en el grupo femenino las correlaciones fueron estadísticamente significativas. Dado que grupos de diestros, ambidiestros y zurdos no presentan las mismas asociaciones entre lateralidad de pie y mano consideramos mas adecuado en el análisis de la lateralidad y sus problemáticas clínicas estudiar separadamente estos grupos. Esto sería de interés, si se considera que la no-dexidad en la lateralidad sería un factor de riesgo para enfermedades autoinmunes, migranias, entre otras de acuerdo a trabajos de Geschwinian Cluster.

- 103. Las Endotelinas 1 y 3 modulan la actividad de la Tirosina Hidroxilasa a través de los receptores ETA y ETB en el Hipotálamo Anterior y Posterior de ratas normotensas.** Guillermina Legaz(1), Sergio I. Vasilev(1), Liliana G. Bianciotti(2), Marcelo S. Vatta(1).

(1)Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. (2)Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
mvatta@ffyb.uba.ar

Dentro del SNC, el hipotálamo presenta una elevada expresión de ARNm y una alta densidad de sitios receptores para ETs (ETA y ETB). Objetivo: determinar los efectos de ET 1 y 3 sobre la actividad de TH y receptores involucrados. Se extrajo el hipotálamo de ratas machos Sprague-Dawley (Brain Res. 508:301, 1990) y la actividad fue medida en la región anterior y posterior. Los resultados expresan la fracción de actividad de TH. * $p < 0.05$ respecto de Control (ANOVA y 't' modificado por Bonferroni) con $5 < n < 8$. Ant. 0.5h : C=1.00±0.04, ET-1=0.73±0.05*, ET-3=0.72±0.06*; 6.0h: C=1.00±0.05, ET-1=0.65±0.03*, ET-3=0.70±0.07*. Post. 0.5h: C=1.00±0.08, ET-1=0.82±0.02*, ET-3=0.71±0.04; 6.0h: C=1.00±0.07, ET-1=1.70±0.06*, ET-3=1.50±0.08*. Con respecto con los receptores involucrados: BQ-610 (antagonista ETA). Ant. 0.5h: C=1.00±0.04, BQ+ET-1=0.77±0.06*, BQ+ET-3=0.90±0.03*; 6.0h: C=1.00±0.03, BQ+ET-1=0.81±0.07*, BQ+ET-3=1.30±0.05*. Post. 0.5h: C=1.00±0.05, BQ+ET-1=0.91±0.03, BQ+ET-3=0.81±0.03*; 6.0h: C=1.00±0.05, BQ+ET-1=0.71±0.05*, BQ+ET-3=1.52±0.10*. BQ-788 (antagonista de ETB). Ant. 0.5h: C=1.00±0.02, BQ+ET-1=0.92±0.03*, BQ+ET-3=1.00±0.4; 6.0h: C=1.00±0.05, BQ+ET-1=0.63±0.05*, BQ+ET-3=0.86±0.11. Post. 0.5h: C=1.00±0.02, BQ+ET-1=1.03±0.04, BQ+ET-3=1.09±0.08; 6.0h: C=1.00±0.05, BQ+ET-1=1.69±0.17*, BQ+ET-3=0.72±0.06*. Se puede concluir que ambas ETs modulan la actividad de TH mostrando diferentes comportamientos y afinidad a sus receptores en las regiones hipotalámicas estudiadas.

104. Desoxicorticosterona (DOCA) induce cambios del ARNm de la Na,K-ATPasa en el circuito regulatorio del apetito salino. Luciana Pietranera(1), Flavia E. Saravia(1), Alejandro F. De Nicola(1).

(1)Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA e Instituto Biología y Medicina Experimental
mailto:lpetra@dna.uba.ar

El tratamiento con DOCA acetato de animales intactos induce apetito por 3% NaCl a las 24-48 hs del tratamiento. La localización neuroanatómica de la acción de DOCA es cuestión de debate; resultados previos demostraron activación de Fos en neuronas de zonas hipotalámicas anteriores, núcleo paraventricular (PVN), supraóptico (SON) y amígdala (AMIG) de ratas que recibieron DOCA. En el presente trabajo se estudió por hibridación in situ la expresión del ARNm de la subunidad no catalítica de la Na,K-ATPasa empleando una sonda que reconoce la isoforma neuronal b1 de la enzima. Mediante análisis de imágenes computarizado, establecimos que en la AMIG, DOCA inhibe este ARNm (45.9 ± 7.2 vs. control 78.2 ± 6.4 granos por célula, $p < 0.01$) mientras que lo estimula en el núcleo mediano preóptico (MnPO, 24.6 ± 2.8 vs control 10.6 ± 1.5 , $p < 0.005$), núcleo de la estria terminal (BNST, 37.2 ± 1.7 vs control 26.8 ± 2.4 , $p < 0.001$); area preoptica medial (MPO, 32.1 ± 2.9 vs. 17.9 ± 1.7 , $p < 0.001$), y lo estimula pero no significativamente en el PVN (43.1 ± 6.1 vs. 26.3 ± 3). Teniendo en cuenta la función de la Na,K-ATPasa en el intercambio Na/K, sugerimos que su estimulación o inhibición conduciría a la depleción o incremento del sodio intracelular. Estos mecanismos desencadenarían el apetito por el sodio al actuar el mineralocorticoide sobre neuronas sensibles del circuito neuroendocrino originado en la AMIG, y que por vía del BNST proyecta a núcleos y regiones hipotalámicas anteriores.

105. Cambios cognitivos y motivacionales por inhalación prolongada de beta-agonistas en la rata. Pedro C. Elías(1), Delia Sagua(2), Edgardo O. Alvarez(3).

(1)Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo (2)Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo (3)UNEFSCO, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.
mailto: ealvarez@fmed2.uncu.edu.ar

Se sabe que los agentes adrenérgicos participan en los mecanismos centrales de la memoria. Se conoce poco si también

actúan en otros procesos cerebrales como la motivación. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la administración de beta-adrenérgicos por inhalación forzada podría afectar los procesos de memoria y/o motivación exploratoria en ratas. Se usaron animales adultos expuestos 2 veces al día por 5 min en una cámara de nebulización cargada con soluciones 1.3(n=12), 13 (n=11) y 130 mM (n=16) de Salbutamol por 15 días. Salina (n=13) se consideró control. 24 h después del tratamiento, todos los grupos se evaluaron en pruebas del aprendizaje de una respuesta de evitación condicionada (procesos cognitivos) y exploración de un laberinto en cruz elevado asimétrico (procesos motivacionales). Los resultados mostraron que la dosis más baja de Salbutamol facilitó la motivación exploratoria del brazo considerado más conflictivo (12.37 ± 2.2 Vs 3.59 ± 0.98 s, Salbutamol Vs Salina, $p < 0.01$) sin afectar la emocionalidad. La misma dosis disminuyó significativamente la latencia de escape (10.54 ± 3.86 s Vs 33.73 ± 8.29 s, Salbutamol Vs Salina, $p < 0.01$), mejorando la eficiencia de aprendizaje ($100 \pm 14\%$ Vs $0 \pm 17\%$, Salbutamol Vs Salina, $p < 0.01$). Sin embargo, dosis más altas provocaron el efecto contrario. En conclusión, los datos confirman la eficacia de la vía de administración y la participación de beta-agonistas en la memoria y motivación.

ONCOLOGÍA II

106. Acción antimetastásica de la desmopresina (DDAVP) en un modelo murino de manipulación quirúrgica experimental de tumores mamarios. Santiago Girón(1), Agueda M. Tejera(1), Giselle V. Ripoll(1), Daniel E. Gomez(1), Daniel F. Alonso(1).

(1)Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires.
mailto:dfalonso@unq.edu.ar

Se ha reportado la presencia de células tumorales circulantes durante y después del acto operatorio en pacientes sometidas a cirugía de cáncer de mama y existen evidencias de la movilización de células hacia los ganglios axilares luego de biopsias mamarias. Investigamos los efectos de la DDAVP, un análogo sintético de la vasopresina con propiedades hemostáticas y fibrinolíticas, empleando un modelo de manipulación experimental sobre el carcinoma mamario murino F3II. El día 0, un total de 40 ratones hembra BALB/c recibieron 200.000 células F3II en el espacio subcutáneo del flanco. A partir del día 14, los tumores primarios fueron sometidos a manipulación con una presión controlada de 0.5 kg/cm^2 durante 2 min bajo anestesia, seguido o no de extirpación quirúrgica. Al día 60 se efectuaron autopsias y estudio histopatológico. La DDAVP se administró i.v. en 2 dosis de 2 ug/kg, la primera 30 min antes de la manipulación y la segunda 24 h después. La manipulación favoreció la diseminación locorregional y aumentó hasta 8 veces las metástasis en pulmón. El tratamiento con DDAVP disminuyó dramáticamente el porcentaje de animales manipulados con ganglios axilares positivos (Control: 87% vs DDAVP: 12%; $p < 0.05$) y provocó un descenso no significativo en el número de nódulos metastásicos en pulmón (Control: Md 27, rango 5-95 vs DDAVP: 9, 0-58; $p = 0.065$). Los resultados sugieren que la DDAVP sería capaz de reducir la diseminación asociada a la manipulación de un carcinoma mamario.

107. Alteraciones en el balance alélico de la región 10q22-qter en cáncer de próstata. Gustavo J. Leirós(1), Guillermo Rendón(1), Romina P. Montani(1), Silvia Galliano(2), Inés Stella(2), Mario E. Sember(3), Steffen Hollmer(3), Tomás Kahn(1), Kumiko Eiguchi(1).

(1)Cátedra de Bioquímica e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador (2)Cátedra de Patología, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador (3)Servicio de Urología, Hospital Israelita

gleiros@hotmail.com

Introducción: La pérdida de DNA es un evento común en la carcinogénesis de la mayoría de los tumores y en particular la

monosomía del cromosoma 10 en algunos de ellos. Varios estudios identificaron deleciones parciales en 10q especulando la existencia de 1 o mas genes supresores de tumor (TSGs) en la región 10q21-qter. **Objetivos:** Estudiar el balance alélico en 10q22-q26 en adenocarcinomas de próstata (ACP) e hiperplasias benignas de próstata (HBP) a través de secuencias de DNA microsateélites. **Materiales y métodos:** Muestras de ACP (n=10) e HBP (n=12) y muestras de sangre periférica fueron obtenidas de pacientes mayores de 65 años. La pérdida de heterocigocidad (LOH) fue estudiada mediante PCR de las secuencias microsateélites D10S209 (10q24-26), D10S215 y D10S541 (10q22-23), electroforesis en poliacrilamida desnaturizante al 6% y tinción argéntica. **Resultados:** LOH en ACP: D10S209: 5/9 (55.5%), D10S215:1/8 (12.5%) y D10S541:1/7 (14.3%). LOH en HBP: D10S209: 0/10 (0%), D10S215:1/11 (9%) y D10S541:1/8 (12.5%). **Conclusiones:** Estos resultados apoyan la hipótesis previa de la existencia de al menos un TSG asociado a ACP en la región mas distal del cromosoma 10 (10q24-26). Las HBP mostraron un bajo porcentaje de LOH en esta misma región, lo que indicaría la ausencia de alteraciones importantes asociadas a estas lesiones benignas.

108. Expresión de APM-1 (posible tsg) en muestras de lesiones prostáticas. Romina P. Montani(1), Guillermo Rondón(1), Javier Mendizabal(1), Gustavo J. Leirós(1), Mario E. Sember(2), Kumiko Eiguchi(1), Elisabeth Schwarz(3).

(1)Cátedra de Bioquímica e Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad del Salvador (2)Servicio de Urología, Hospital Israelita (3)Deutsche KrebsForschungsZentrum (DKFZ)-Heidelberg
rominapm@uol.com.ar

Introducción: El Cáncer de Próstata (CP) es la 2º causa de mortalidad por cáncer en hombres. En cromosoma 18q21 se encontró una alta LOH en varios tipos de tumores, esto indicaría la presencia de TSGs. Al momento se han identificado DCC, Smad4 y Smad 2 pero se plantea que existiría al menos un TSG más en la región. APM-1 es un novedoso gen descubierto en líneas celulares de cáncer de cervix, ubicado en 18q21. Resultados publicados soportan la hipótesis de que sería un posible TSG y se encontró expresión en casi todas las líneas celulares estudiadas al momento. **Objetivo:** Analizar la posible existencia de un patrón de expresión de APM-1 en muestras frescas de CP e hiperplasias benignas (HBP). **Materiales y Métodos:** Se analizaron muestras (n=23) de 20 pacientes (>65años), previo consentimiento. Se extrajo RNA total por kit y método AGPC. Se obtuvo cDNA por RT. Se determinó presencia de GAPDH tras PCR y posterior corrida del producto en geles de agarosa 1,5%. Por PCR (primers EX23R2, EX23F2) se amplificó un fragmento de 262pb de APM-1 que se evidenció por Southerblot (sonda MV14). **Resultados:** 13/23 muestras fueron positivas para GAPDH (4 CP y 9 HBP). Se encontró señal APM-1 positiva en 7/13 muestras 2/4 para CP y 5/9 para HBP. **Conclusiones:** APM-1 se expresa en muestras frescas de lesiones prostáticas. El patrón de expresión (alto en tejido benigno y heterogéneo en maligno) concordaría con los resultados previos para líneas celulares. APM-1 jugaría un papel en el desarrollo de CP

109. Inhibición del desarrollo tumoral en ratones C57BL6 inmunizados con células dendríticas co-cultivadas con células apoptóticas de melanoma murino B16F1. Silvana R. Goldszmid(1), Laura Bover(2), José Mordoh(2), Rosa Wainstok(3).

(1)FCEN-UBA/IIB-BA Fundación Campomar (2)IIB-BA Fundación Campomar (3)FCEN-UBA
mailto:rgoldszmidleloir.org.ar

Las células dendríticas (CD) juegan un rol crucial en la inducción de repuesta anti tumoral efectiva. El objetivo de este trabajo fue estudiar si la inmunización con CD co-cultivadas con células

de melanoma apoptóticas induce protección contra un desafío tumoral. La apoptosis de células B16F1 (Apo) fue inducida por radiación (70Gy) y evidenciada por tinción con AnexinaV-FITC. CD derivadas de médula ósea (5 días de cultivo) fueron co-cultivadas con Apo durante 24hs en relación 1:1 (CD:Apo). Ratones C57BL6 (8 semanas) fueron inyectados en forma subcutánea con 200.000 CD:Apo, CD, Apo, CD+Apo (sin co-cultivar) o vehículo semanalmente durante 4 semanas. En la semana 5 recibieron un desafío tumoral con 13.000 células B16F1 viables. 13 semanas post desafío permanecía libre de tumor 80% de los ratones del grupo CD:Apo y 0-17% de los ratones de los grupos control (Wilcoxon, p<0,05). El tamaño tumoral alcanzó 15,4 cm³ (0,03 - 28,1 cm³) en los grupos control y 0 cm³ (0 - 3,6 cm³) en el grupo CD:Apo (Wilcoxon, p<0,05). Los ratones del grupo CD:Apo libres de tumor recibieron un segundo desafío tumoral 13 semanas después de iniciado el plan de inmunización. 89 % de los animales permanecía libre de tumor 12 semanas post segundo desafío, sugiriendo la presencia de memoria inmunológica. El presente trabajo indicaría el potencial de las CD:Apo para su utilización en la inmunoterapia del cáncer.

110. Caracterización in vitro de células dendríticas humanas derivadas de monocitos: fagocitosis de células apoptóticas allogeneicas de melanoma. Laura Bover(1), Leticia Machiavelli(2), Beatriz Reyes(3), Paula Longhi(2), Patricia Tschurl de Motta(2), Gabriel Cacic(3), Marcela Barrio(3), Adriana Mantegazza(3), Silvana R. Goldszmid(4), Rosa Wainstok(5), José Mordoh(1).

(1)IIB-BA Fundación Campomar/CIO-FUCA (2)CIO-FUCA (3)IIB-BA Fundación Campomar (4)FCEN-UBA-IIB-BA Fundación Campomar (5)FCEN-UBA
mailto:lbover@leloir.org.ar

Las células dendríticas (CD) son potentes estimuladoras de la activación de células T, pudiendo, post-fagocitosis de células tumorales apoptóticas, inducir linfocitos citotóxicos. Nuestro objetivo fue: a) Caracterizar fenotípicamente CD humanas inmaduras diferenciadas a partir de monocitos de sangre periférica; b) Investigar su capacidad de fagocitar células allogeneicas apoptóticas de la línea de melanoma humano IIB-MEL-IAN. Las CD fueron obtenidas en medio AIM-V conteniendo rhu GM-CSF y rhu IL-4. A los 5 días se determinó por citometría de flujo (FACS) el porcentaje de positividad para los marcadores CD86 (34%), CD40 (27%), HLA II (45%) y sLeX (21%). La capacidad fagocítica de CD se estudió sobre células IIB-MEL-IAN irradiadas (50, 70 y 100 Gy). La dosis de 70 Gy indujo 78% de células apoptóticas a las 48 hs, definidas por su tinción positiva para anexina y negativa para yoduro de propidio. Dichas células teñidas con PKH-26 (fluorescencia roja), se cocubaron durante 0, 2 y 24 hs a 37°C con CD de 5 días (1:1). Los cocultivos se marcaron con anti-CD86-FITC o anti-sLeX-FITC (fluorescencia verde) y se analizaron por FACS. Se demostró fagocitosis por la presencia de 25% de células doble-positivas (fluorescencia roja y verde). Por microscopía confocal se comprobó que las células de doble tinción correspondían a CD conteniendo cuerpos apoptóticos. El presente modelo resulta de interés para explorar el desarrollo de inmunoterapia basada en CD.

111. Efecto del agregado de ciclofosfamida a un modelo de inmunoterapia experimental murina por transferencia adoptiva de células derivadas de una respuesta inmune secundaria. Carlos Ponzinibbio(1), Rubén P. Laguens(1).

(1)Cátedra de Patología, Facultad de Cs Médicas. UNLP
carlopon@atlas.med.unlp.edu.ar

En trabajos anteriores se puso en evidencia que la transferencia adoptiva de células linfoides de ganglios linfáticos que drenan una respuesta secundaria al tumor, era capaz de contener el crecimiento tumoral en ratones con un carcinoma en crecimiento (Int J Hematol 72:158,2000). Con el fin de evaluar la capacidad de potenciar el efecto antitumoral de las células transferidas, se ensayó el agregado de ciclofosfamida (CF) por vía intraperitoneal

al modelo de inmunoterapia adoptiva previamente descrito. Ratones F1 obtenidos de la cruce entre BALBc y C3Hs fueron desafiados con 10.6 células tumorales por vía subcutánea. Se establecieron 4 lotes de 6 ratones cada uno: A) control: PBS por vía IP; B) CF: 50 mgs / kg día por tres días (+4,+5 y +6); C) recibieron el día +7: 10.6 células linfoides obtenidas de ganglios de respuesta secundaria al tumor; y D) el mismo esquema de CF con el agregado de igual cantidad de células linfoides el día +7. Los resultados expresan la media de por lo menos dos experimentos + DE y representan el tamaño del tumor el día + 14 en relación al tamaño del tumor el día + 4: Lote A) 10.18 +- 1.4, Lote B) 3.15 +- 0.8 lote C) 2.5 +- 1.01 y lote D) 2.3 +- 0.9. Estos resultados evidencian que la CF, en la dosis y en los tiempos usados, es por sí misma capaz de reducir el crecimiento tumoral (Lote B vs lote A. $p < 0.001$) y no modifica en forma significativa la capacidad antitumoral de las células transferidas (Lote D vs lote C: p NS)

112. Variación en la expresión de factor de crecimiento fibroblástico (FGFb) y fase S en las etapas tempranas de la carcinogénesis bucal experimental. Ana R. Raimondi(1), María E. Itoiz(1).

(1)Cát. de Anatomía Patológica, Fac. de Odontología, UBA. LANAIS- Microespectrofotometría, CONICET-CNEA mailto:rosar71@yahoo.com

La cancerización con DMBA (7,12-dimetilbenzotraceno) de la bolsa de la mejilla del hamster es el modelo universal de cáncer bucal. Las lesiones premalignas y tumorales son iguales a las de la boca humana. Se ha reportado la sobreexpresión de FGFb en carcinomas bucales. El objetivo fue analizar el rol biológico del FGFb en la carcinogénesis bucal y su valor como marcador precoz de malignidad. Se utilizaron 32 hamsters topocados con DMBA al 0,5% 3 veces por semana durante: 6, 7, 8, 9 y 10 semanas. Se eligieron zonas de: epitelio sin cambios histológicos (NUMF: non unusual microscopic findings), preneoplasia (PREN: hiperplasias, displasias), carcinoma in situ (CIS) y epitelios control (C). La expresión inmunohistoquímica de FGFb y bromodeoxiuridina (BrdU) se cuantificaron por análisis de imágenes con el grado de marcación suprabasal (GMS) de FGFb y la fase S con el índice de marcación (LI). El FGFb presentó variaciones de su expresión en todas las zonas. Las áreas NUMF (GMS=0.17±0.01) difieren del C (0.03±0.01, $p < 0,05$ N-K) a la semana 7. Las zonas PREN presentaron valores de GMS aumentados vs el C ($p < 0,05$). En áreas CIS se observó marcación homogénea en el espesor epitelial. El LI mostró su mayor aumento en las áreas NUMF a la semana 8 (0.29±0.04) vs C (0.045±0.01). El FGFb jugaría un importante rol en las modificaciones iniciales de la interfase epitelio-conectivo, con un aumento temprano en áreas NUMF, constituyendo un eficiente marcador de cancerización de campo.

113. La síntesis de ADN en gliomas humanos es regulada por una vía proteolítica independiente del proteosoma y de las calpainas. Marina Vita(1), Juan S. Yakisich(1), Jorgen Boethius(2), Ingrid Ohlsson Lindblom(2), Victor Idoyaga Vargas(3), Ake Siden(4), Mabel Cruz(1).

(1)Clinical Research Center, Karolinska Institute, Novum, Huddinge University Hospital, Sweden (2)Department of Neurosurgery, Karolinska Hospital, Karolinska Institutet, Sweden (3)I.I.B., Fundación Campomar, FCEyN, U.B.A. Buenos Aires, Argentina (4)Department of Neurology, Karolinska Institute, Huddinge University Hospital, Sweden mailto:Marina.Vita@kfcmail.hs.sll.se

El proteosoma representa la mayor actividad proteolítica en las células de mamíferos y controla directamente la transición G1/S y G2/M del ciclo celular. Estudiamos el efecto de altas concentraciones de 7 diferentes inhibidores de proteasas sobre la síntesis de ADN en 16 especímenes de gliomas humanos. Las muestras fueron obtenidas durante craneotomías de rutina con fines

terapéuticos. La síntesis de ADN fue determinada inmediatamente luego de la resección del tumor mediante la incorporación de 3H-metil-timidina a ADN utilizando el método de las miniunidades de tejido previamente descrito y tiempos cortos de incubación (0-120 minutos). Esta estrategia permite estudiar la progresión de la fase S del ciclo celular. La lactacistina y clastolactacistina (inhibidores selectivos del proteosoma, ambos a 100 uM), el MG-132 (un inhibidor poco selectivo del proteosoma, 100 uM) y los inhibidores de calpainas I y II (inhibidores específicos de la calpaina I y II respectivamente, ambos a 200 uM) no tuvieron efecto significativo sobre la síntesis de ADN. El PSI (100 uM), otro inhibidor poco selectivo del proteosoma y el TPCK (500 uM), un inhibidor de serina proteasas inhibieron la síntesis de ADN (37 %, $P < 0,0001$ y 65%, $P < 0,0001$ respectivamente). Estos resultados sugieren que otra vía proteolítica diferente al proteosoma y las calpainas regula la progresión de la fase S ciclo celular en gliomas. La identificación de estas proteasas podría representar un nuevo blanco terapéutico.

114. Análisis de la secuencia del gen BNLF-1 en tumores pediátricos asociados al virus de Epstein Barr. Paola A. Chabay(1), Elena De Matteo(2), Saúl Grinstein(1), María V. Preciado(1).

(1)Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (2)Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez paola_chabay@yahoo.com.ar

El virus Epstein Barr (EBV) está asociado a ciertas patologías malignas, como carcinoma nasofaríngeo (CNF), linfomas de Hodgkin (LH) y no Hodgkin (LNH). La proteína LMP-1, codificada por el gen BNLF-1, es considerada oncogénica por sus múltiples interacciones con factores de transcripción a través de su extremo C-terminal. Se han descrito delecciones de 30pb y mutaciones puntuales, asociadas con un aumento de la vida media en el extremo 3' del gen BNLF-1 que codifica para el C-terminal de LMP-1. Nos propusimos estudiar estas alteraciones en tumores pediátricos. Se estudiaron biopsias ganglionares de 15 pacientes (2-14 años, mediana 8, 12 varones y 3 mujeres): 3 LNH, 8 LH y 4 CNF. Se analizó la presencia de EBV por inmunohistoquímica para LMP-1, hibridación in situ para EBERs, y por PCRs para EBNA-3C (tipificación) y LMP-1. En las muestras LMP-1+, se secuenció el extremo 3' del gen BNLF-1. En 11/15 muestras se amplificó un fragmento de 286pb (2 LNH, 6 LH, 3 CNF), mostrando una delección de 30 pb que abarca del codon 343 al 352 respecto a LMP-1 wild-type. Además, estos 11 casos mostraron mutaciones puntuales conservadas. La delección de 30pb y las mutaciones puntuales se observaron tanto en EBV-1 como EBV-2. La delección C-terminal de LMP-1 incrementaría su nivel de expresión, lo cual puede asociarse con un mayor potencial tumorigénico de la proteína y un fenotipo clinicopatológico más agresivo.

115. Detección del virus de Epstein Barr en carcinomas invasivos de mama. María V. Preciado(1), Paola A. Chabay(1), Hugo Gass(2), Elena De Matteo(3), Pedro Gonzalez(4), Andrea Ferrero(2), Andrea Actis(5), Raquel Romero(6), Saúl Grinstein(1).

(1)Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (2)Servicio de Mastología, Hospital de Agudos MV de Martínez (Tigre) (3)Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (4)Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Agudos MV de Martínez (Tigre) (5)Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA (6)Servicio de Ginecología, Hospital Velez Sarsfield preciado2conicet.gov.ar

El virus de Epstein Barr (EBV) es oncogénico y está asociado al desarrollo linfoma de Burkitt endémico, carcinoma nasofaríngeo indiferenciado, linfomas no-Hodgkin en inmunosuprimidos, parte de los linfomas de Hodgkin. Recientemente se los ha relacionado con el desarrollo de ciertos carcinomas. Dado que

el cancer (ca.) de mama es el tumor más frecuentes en mujeres en todo el mundo, en este trabajo investigamos la presencia de EBV en ca. de mama y su correlación con el grado histológico, receptor de estrógenos (RE), edad y presencia de ganglios. Se estudiaron 53 pacientes con ca. primario invasivo de mama, rango de edad: 35-87 años. Sobre cortes de biopsias fijadas e incluidas en parafina se investigó la presencia del EBV mediante la detección de EBNA-1 por inmunohistoquímica. En 23/53 muestras se extrajo ADN de buena calidad (gen de β globina positivo) para amplificar por PCR un fragmento de 108 pb correspondiente a la región EBER-2. En 17/53 casos (32%) se observó tinción nuclear granular en las células tumorales para EBNA-1. De los 5/23(22%) casos en los que se recuperó ADN fueron positivos. Los resultados positivos y negativos obtenidos por inmunomarcación y PCR mostraron correlación ($p=0,05$). La presencia de EBV fue mayor en los casos con metástasis ganglionar 40% vs. 20%, pero no correlacionó con grado histológico, RE ni edad. El EBV estaría involucrado en la transformación maligna que lleva al desarrollo de un subgrupo de ca. invasivo de mama.

116. Tratamiento del síndrome de caquexia/anorexia (sac) con indometacina (indo) y acetato de medroprogesterona (mpa) en portadores de tumor murino (p07). Guillermo Peluffo(1), Miriam J. Diament(1), Isabel M. Stillitani(1), Leandro A. Cerchietti(1), Alfredo Navigante(1), Slobodanka M. Klein(1).

(1)Instituto de Oncología A.H. Roffo
dklein@radar.com.ar

Las citoquinas proinflamatorias intervienen en la patogénesis del síndrome paraneoplásico SAC. El MPA reduce la producción de citoquinas y mejora los síntomas del SAC. Nuestro objetivo fue estudiar si el tratamiento con MPA y/o un antiinflamatorio no esteroide (AINE), Indometacina, puede inhibir el SAC, modular la respuesta inflamatoria/inmune y disminuir la diseminación metastásica en portadores del tumor P07, que desarrollan SAC. Ratonés BALB/c transplantados con P07, fueron tratados con: a) Indo (10 μ g/ml oral, $n=10$), b) MPA (1.2 mg s.c., $n=10$) y c) ambas drogas ($n=10$). Se determinó el peso de los animales(PC), crecimiento del tumor primario, metástasis pulmonares, niveles en suero de IL1b por ELISA y citotoxicidad mediada por esplenocitos por MTS. Se realizó la autopsia a los 30 días de portación del tumor.

	Control	MPA	Indo	MPA+Indo
Vol. tumoral (mm3)	407 \pm 78	390 \pm 56	211 \pm 35*	233 \pm 27*
% PC inicial	89 \pm 4.2	110 \pm 3 *	99 \pm 4*	111 \pm 2*
Metástasis/ pulmón	57 \pm 9	45 \pm 9	38 \pm 7*	29 \pm 8*
Citotoxicidad (%)	46 \pm 3	69 \pm 4*	72 \pm 6*	41 \pm 4
IL1b (pg/ml)	34 \pm 4	25 \pm 2.4	26 \pm 5.4	14 \pm 1.4*

* significativo vs control

Indo y MPA incrementan el peso corporal y aumentan la respuesta de células citotóxicas, probablemente debido a la disminución de una respuesta inflamatoria sistémica, e inhiben la diseminación metastásica. El tratamiento combinado mostró un efecto sinérgico.

117. Eficacia de la asociación de acetato de medroprogesterona (mpa) con celecoxib en el control del síndrome anorexia/caquexia (sac) en pacientes (pts) con adenocarcinoma de pulmón avanzado (cpa). Leandro A. Cerchietti(1), Isabel M. Stillitani(2), Guillermo Peluffo(2), Miriam J. Diament(3), Slobodanka M. Klein(2), Alfredo Navigante(4).

(1)Dpto. Clínica Médica. Instituto de Oncología A.H. Roffo
(2)Area Investigación. Instituto de Oncología A.H. Roffo
(3)Area Investigación. Instituto de Oncología A.H. Roffo
(4)Dpto. Clínica Médica. Instituto de Oncología A.H. Roffo

El SAC afecta el 70% de los pts con CPA disminuyendo la duración y calidad de vida, sin disponer de tratamientos efectivos para su control. Nuestro objetivo fue determinar la eficacia de la asociación de MPA con un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) específico de COX2, celecoxib, en el control de la respuesta inflamatoria sistémica (RIS) y las manifestaciones bioquímicas y clínicas del SAC en pts con CPA. Se incluyeron 15 pts en estadios IIIb y IV, con más de 10% de pérdida de peso, anorexia y evidencia de RIS. Durante el estudio (6 semanas), ningún paciente recibió otro tratamiento. Al inicio y semanalmente, se evaluó capacidad funcional física (PS-ECOG), apetito, náuseas y fatiga por escalas numéricas, peso, agua corporal total por bioimpedanciometría e ingesta calórica. Se determinó en sangre proteína C reactiva (PCR), IL-6, GM-CSF, albúmina, proteínas totales, hemograma e ionograma. Resultados: Trece pts ganaron peso (2 - 6.44 kg) o permanecieron estables, 2 pts continuaron perdiendo peso con una tasa menor que la inicial. Todos los pts aumentaron el apetito (2 a 8.1; $p=0.03$) y disminuyeron fatiga (7.9 a 4.9 ; $p=0.01$) y náuseas.(3.18 a 0; $p=0.04$) Los niveles basales de IL-6 fueron mayores que dadores sanos. Los niveles de IL6 y PCR se correlacionaron entre sí (Spearman), e inversamente con la variación del peso ($r=-.9147$). Concluimos que la asociación de MPA con celecoxib resultó ser un tratamiento efectivo en el control del SCA en pacientes con adenocarcinoma de pulmón

REPRODUCCIÓN I

118. Proliferación y diferenciación celular del parénquima mamario durante la gestación en ratas nulíparas versus múltiparas. Laura Kass(1), Jorge G. Ramos(1), Enrique H. Luque(1), Mónica Muñoz de Toro(1).

(1)Lab. Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Fac. Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL.
mailto:eluque@fcb.unl.edu.ar

La glándula mamaria posee ciclos de proliferación y diferenciación celular durante la gestación. Nuestro objetivo fue estudiar las modificaciones en proliferación, diferenciación y expresión de receptores esteroides en el parénquima mamario de ratas nulíparas vs múltiparas (con y sin lactancia). Las mamas fueron estudiadas en día 9 de gestación, antes del sacrificio los animales recibieron bromodeoxyuridina. Los marcadores evaluados fueron identificados en las células mioepiteliales (mioep) usando doble inmunomarcación con actina de músculo liso. Se cuantificó la densidad lineal de las células mioep como indicador de diferenciación. Se estudió la expresión de lactoalbúmina, p63 (marcador de mioep), receptor de estrógeno alfa (RE) y progesterona (RP). En las múltiparas, las células lumbinales presentaron menor proliferación y expresión de RP pero mayor expresión de lactoalbúmina y RE que las nulíparas. Las células mioep, en las múltiparas, tuvieron menor proliferación, mayor densidad lineal (sólo las con lactancia) y no expresaron RP. El número de células mioep y su expresión de RE no sufrieron variaciones. La menor expresión de RP en las células lumbinales podría asociarse con la menor actividad proliferativa del parénquima mamario en hembras con gestaciones previas, mientras que la mayor expresión de lactoalbúmina y RE indicarían mayor grado de diferenciación celular. Estos resultados podrían explicar el efecto protector de la gestación en la incidencia del carcinoma de mama.

119. Participación del Sistema Opiode en la regulación de la secreción de prolactina (PRL) al final de la preñez en la rata. Rol de GABA. Marta Soaje(1), Ricardo P. Deis(1).

(1)Laboratorio de Reproducción y Lactancia, CONICET, Mendoza
mailto:msoaje@lab.cricyt.edu.ar

Demostramos que los péptidos opioides endógenos regulan la secreción de PRL en la preñez. La administración del antagonista opioide naloxona (NAL) a ratas tratadas con el antiprogesterona mifepristone (M) en el día 19 de preñez aumentó la PRL sérica. Objetivo: determinar si en dicho incremento participaría el Siste-

ma GABAérgico además del Sistema Dopaminérgico. Metodología: se utilizaron ratas canuladas en el ventrículo lateral el día 15 de preñez. En el día 19 fueron tratadas con M 5 mg/kg s.c ó aceite (8 h) y NAL 2 mg/kg ó salina (SAL), ip (17.30 h). Los antagonistas GABA A (SR 95531, 15 ng/3ml) y GABA B (Phaclofén, 25 ng/3ml) se administraron icv 15 min antes de NAL. Muestras de sangre para determinar PRL por RIA se obtuvieron por decapitación a las 18 h. Resultados: la administración de los antagonistas GABA A ó B a ratas tratadas con aceite no tuvo efecto sobre los niveles de PRL tanto en los grupos tratados con SAL ó NAL. El tratamiento con los antagonistas GABAérgicos no modificó los niveles de PRL en las ratas tratadas con M + SAL, pero previno el incremento de PRL inducido por NAL: M+NAL: 140.07 ± 16.71 ng/ml, M+SR+NAL: 9.59 ± 3.74 ng/ml, M+P+NAL: 5.64 ± 2.53 ng/ml. Conclusiones: estos resultados sugieren que el bloqueo de los receptores GABA A y B con antagonistas específicos, previene la secreción de PRL inducida por M + NAL, indicando una co-participación de los Sistemas Opióide y GABAérgico en la regulación de la secreción de PRL al final de la gestación.

120. Correlación entre respuestas neuroendocrinas maternas inmediatas a la succión del pezón y parámetros físicos de la succión. Ethel V. Velásquez(1), Hugo G. Cárdenas(1), Horacio B. Croxatto(2), Carmen Lladós(3).

(1)Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile (2)Instituto Chileno de Medicina Reproductiva, Santiago, Chile (3)Unidad de Reproducción y Desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile
mailto: ethelvelasquez@hotmail.com

Durante el amamantamiento los parámetros físicos de la succión (PFS) y el aumento de los niveles maternos de Ocitocina (OT) y Prolactina (PRL) en respuesta a la succión del pezón presentan alta variabilidad entre distintas mujeres. Para explorar si la magnitud de las respuestas maternas de OT y PRL a la succión se correlacionan con la magnitud de los PFS y la transferencia de leche (TL), se registró la presión de succión durante la mamada al primer pecho en un grupo de bebés en lactancia exclusiva entre los 40 y 50 días post-parto. Simultáneamente, comenzando 1-2 min antes del inicio de la succión, se tomaron muestras seriadas de sangre materna durante 10 min y en intervalos de 15 seg, para la determinación de OT. Dos muestras adicionales fueron extraídas a 10 y 30 min de iniciada la succión para determinar los niveles de PRL. La TL fue estimada pesando a los bebés antes y después de mamar de cada pecho. Los PFS, TL y los niveles de OT y PRL presentaron gran variabilidad entre un par madre-bebé y otro, sin embargo se encontró que las respuestas hormonales maternas se correlacionan significativa ($R_s=0.578-0.852$, $p<0.05$) y diferencialmente con la cantidad de leche transferida y ciertos PFS. En conclusión, solo algunos PFS reflejan la magnitud del estímulo sensorial ejercido sobre el pezón y el organismo materno los discrimina generando respuestas neuroendocrinas proporcionales y diferenciales dentro de cada episodio de succión. Financiado por FONDECYT (1960744) y RF (98024 /98)

121. Evaluación de la viabilidad embrionaria y la neurogénesis temprana en la ingesta periconcepcional de alcohol, en el ratón. Elisa Cebal(1), Carolina Pustovrh(1), Carola Yovanovich(2), Alicia Jawerbaum(1), Dante A. Paz(2).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos-CONICET (2)Instituto de Neurociencias- CONICET
mailto:ecebal@hotmail.com

El objetivo fue estudiar los efectos y mecanismos, poco conocidos, del consumo perigestacional de etanol en la organogénesis temprana (histología, inmunocitoquímica para N-CAM (180 kDa), la producción de prostaglandina E (PGE, RIA), la expresión de óxido nítrico sintasa (iNOS, western blot) y la modulación de la ciclooxigenasa (COX) por el óxido nítrico (NO) (por incubación con spermine-NONOATE, 600 μ M). Se intoxicaron

hembras adultas CF1 con 10% etanol en el agua de bebida por 15 días previos a la fecundación y hasta el día 10 de gestación. El No de reabsorciones fue mayor en las hembras tratadas (HT) que en las controles (HC) (HT:3.5±0.7, HC:1.9±0.4, $p<0.05$), con elevado retardo del desarrollo (HT: 27.2%, HC:8.8%, $p<0.001$). El % de embriones vivos se redujo (HT:43.8%,HC:71.1%, $p<0.001$) y se incrementó el % de embriones anormales (región cefálica, tubo neural) (22% vs.10.8%, $p<0.01$). Se vio elevada desorganización del neuroepitelio y disminución de las mitosis. La adhesividad celular reducida fue confirmada por menor expresión de N-CAM. La liberación de PGE embrionaria de las HT fue elevada (3.8±0.5 vs.2.4±0.3). El NONOATE no produjo aumento en la liberación de PGE embrionaria en las HT y sí en las HC (4.2±1.1 vs.7.7±2.1, $p<0.05$). Se detectó mayor expresión de iNOS en las HT. En conclusión, la neuropatía embrionaria por etanol se relacionaría con alteración de la modulación PGE-NO y con pérdida de PGE y de adhesividad por daños celulares inducidos por incremento de NO.

122. Efecto de 15deoxy delta 12,14PGJ2 sobre los niveles de óxido nítrico y sobre el metabolismo lipídico en placenta de ratas sanas y diabéticas. Alicia Jawerbaum(1), Evangelina Capobianco(1), Verónica White(1), Débora Sinner(1), Carolina Pustovrh(1), Elida Gonzalez(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos
mailto:a.jawerbaum@abaconet.com.ar

La 15deoxy delta 12,14PGJ2 (dPGJ2), derivado de la PGD2, es un ligando específico de PPARgamma, con propiedades antiinflamatorias en diversos tejidos. Considerando que agonistas de PPARgamma revierten alteraciones metabólicas inducidas por la diabetes y con el objeto de dilucidar funciones de dPGJ2 en tejido placentario a término, se evalúa la capacidad de dPGJ2 de modular los niveles de NO y de modificar los niveles de triglicéridos y de colesterol en tejido placentario de ratas sanas (C) y diabéticas tipo II (D) obtenidas por administración neonatal de estreptozotocina 100 mg/kg. El tejido placentario es incubado durante 3 hs en presencia de dPGJ2 2x10⁻⁶ M. Finalizada la incubación se evalúan los niveles de nitratos/nitritos según Griess, y los niveles de colesterol y triglicéridos por TLC. Se observa que adiciones de dPGJ2 disminuyen los niveles de nitratos/nitritos (nmol/mg) en tejido placentario C (C: 4±0.2, C+dPGJ2 2.2±0.2 $p<0.01$) y D (D: 4.6±0.5, D+dPGJ2 3±0.3 $p<0.02$). Al evaluar el metabolismo lipídico, se observa que adiciones de dPGJ2 disminuyen los niveles de triglicéridos (TAG, μ g/ μ g prot) y de colesterol (COL μ g/ μ g prot) en placenta C (TAG C: 18±2, TAG C+dPGJ2 8±2 $p<0.05$, COL C 24.7±5, COL C+dPGJ2 5±1 $p<0.01$) y D (TAG D 12±2, TAG D+dPGJ2 4±2 $p<0.05$; COL D 20±5, COL D+dPGJ2 5.8±2 $p<0.05$). Se concluye que dPGJ2 tendría un rol antiinflamatorio y mediador del metabolismo lipídico en tejido placentario de ratas sanas y diabéticas a término.

123. Efecto de PGE2 y de leptina sobre los niveles de óxido nítrico en embriones de rata sana y diabética. Verónica White(1), Alicia Jawerbaum(1), Débora Sinner(1), Carolina Pustovrh(1), Evangelina Capobianco(1), Elida Gonzalez(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos
mailto:whites@ciudad.com.ar

Estudios previos muestran que alteraciones en los niveles de óxido nítrico (NO), mediadores del desarrollo embrionario durante la organogénesis temprana, dan lugar a procesos dismorfogénicos. En el embrión de rata diabética observamos anomalías morfológicas y niveles alterados de prostanoides, evidenciándose cambios en los niveles séricos y placentarios de leptina. Es nuestro objetivo determinar los niveles de NO en el embrión de rata sana (C) y diabética tipo II (D, obtenida por administración neonatal de estreptozotocina, 100 mg/kg), y la capacidad moduladora de PGE2, y de leptina sobre dichos niveles. Embriones C y D de 11 días de gesta se obtienen bajo lupa e incuban en presencia de PGE2 (10⁻⁷M), y de leptina (20 ng/ml)

durante 3 horas. Finalizada la incubación se evalúa el desarrollo organogénico y se dosan los niveles de nitratos/ nitritos (Nit), según método colorimétrico de Griess. Los niveles de Nit (nmoles/mg proteína) se encuentran incrementados en el embrión D (C: 34 ± 3 D: 58 ± 3 $p < 0.01$), observándose tanto en embriones C como D una disminución en los niveles de Nit en presencia de PGE2 (CPGE2: 29 ± 0.5 $p < 0.05$ v C, DPGE2: 39 ± 2 $p < 0.01$ v D) y de leptina (CleP: 22 ± 2 $p < 0.01$ v C; Dlep: 39 ± 4 $p < 0.01$ v D). Los resultados evidencian la capacidad de leptina y de PGE2 de controlar los niveles de NO durante el desarrollo embrionario, cuya sobreproducción se asocia a la aparición de malformaciones congénitas en la patología diabética.

124. Estudio de la participación de la proteína del espermatozoide 'DE' en la activación del ovocito. Dolores Busso(1), Karl Swann(2), Rafael Fissore(3), Vanina G. Da Ros(1), Mauro M. Morgenfeld(1), Patricia S. Cuasnicú(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina. (2)University College London, U.K. (3)University of Massachusetts, U.S.A. dbusso@dna.uba.ar

Durante la fusión de gametas, el espermatozoide desencadena la activación del ovocito, que se inicia con la liberación de Ca^{2+} intracelular. La activación sería producida por la interacción del espermatozoide con un receptor en el oolema, o bien por un factor espermático activador introducido en el ooplasma luego de la fusión. Dado que la proteína espermática de rata DE participa en la fusión de gametas a través de sitios en la superficie del ovocito, el primer objetivo fue estudiar la participación de DE en la activación a través del mecanismo ligando-receptor. La presencia de la proteína en el medio de incubación de ovocitos sin zona pelúcida no provocó la liberación de Ca^{2+} evaluada por fluorescencia de Fura, ni indujo un aumento en el reinicio de la meiosis evaluada por tinción con aceto-carmin, evento que se produce luego de la activación. Dada la alta homología de DE con helotermia, una proteína reguladora de canales rianodínicos, el segundo objetivo fue estudiar si DE regulaba la liberación de Ca^{2+} a través del control de dichos canales intracelulares. La proteína DE microinyectada en ovocitos no provocó la liberación de Ca^{2+} , ni tampoco inhibió la liberación del catión producida por la inyección del factor espermático. En conjunto, los resultados demuestran que la función de DE se encontraría restringida al proceso de fusión, descartando su participación en el evento posterior de activación del ovocito.

125. Marcadores bioquímicos de crecimiento y madurez fetal en líquido amniótico (LA) en embarazadas de riesgo. María B. Di Carlo(1), Sandra D. Muzietti(2), Norma M. Pugliese(3), Gustavo A. Negri(4).

(1)Lab. Gast.y Enz.Clinica-Dpto.Bioq.Clinica-Facultad Farmacia y Bioquímica-UBA (2)Lab.Gast.yEnz.Clinica-Dpto.Bioq.Clinica-Facultad Farmacia y Bioquímica-UBA (3)Lab.Citología - Dpto.Bioq.Clinica-Facultad Farmacia y Bioquímica - UBA (4)Lab.Gast.y Enz. Clínica. Dpto. Bioq. Clínica. Facultad Farmacia y Bioquímica-UBA <mailto:mbdicarlo@dbc.ffyb.uba.ar>

A fin de disminuir las complicaciones asociadas al embarazo, y asegurar un recién nacido sano, es que se intenta desde el laboratorio ofrecer métodos de diagnóstico de las alteraciones del desarrollo fetal. Para evaluar madurez pulmonar (MP): Lecitina/ Esfingomielina (L/E), considerado método patrón, el conteo de cuerpos lamelares (CL) y fosfatasa alcalina termolábil/ gammaglutamiltranspeptidasa (FATL/ GGT). Para el estudio de evolución de otros tejidos (hepático, óseo, renal, salival y placentario) están descriptos: aminotransferasas, fosfatasa ácida, urea, creatinina, amilasa, lactatodehidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina termoestable (Plac). Se estudiaron 53 embarazadas de riesgo (diabetes, hipertensión arterial y retardo en el crecimiento intrauterino) entre 29 y 38 semanas, a las que se siguió clínicamente hasta el momento del parto. Se midió en LA la evolución

de los marcadores mencionados. Se concluye: Para los marcadores de MP: -se observan diferencias significativas entre riesgo (<29 semanas) y no riesgo (>36 semanas) para L/E y CL y no la hay para FATL/ GGT, por lo que podemos inferir que los aumentos de L/E y CL están relacionados con MP. -hay correlación significativa entre L/E y CL y no la hay entre L/E y FATL/ GGT, así CL es una mejor herramienta de evaluación. Para evolución de otros tejidos: no se observaron diferencias significativas, a excepción de LDH y Plac, que presentaron disminución significativa, esta última estaría relacionada con el cese del crecimiento

126. Rol de IGF-1 beta y leptina en la esteroidogénesis ovárica.

Alicia B. Motta(1), Claudio D. González(2), Guillermo Di Girolamo(2).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos- CONICET (2)Dpto. de Farmacología-Facultad de Medicina-UBA <mailto:amotta@sion.com>

El desbalance de factores autocrinos/paracrinos en el ovario conduce a diversos estados patológicos. El objetivo de este estudio fue evaluar la relación entre el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), interleuquina 1 beta (IL1b) y leptina (Lp) en la producción esteroidal por el ovario. Para ello, explantes de ovario de ratas prepúberes Wistar fueron incubados por 24 hs con FSH (10 ng/ml), IGF-1 (10 ng/ml), IL-1b (25 ng/ml) y Lp (100 ng/ml) evaluándose en los sobrenadantes estradiol (E) y progesterona (P) por radioinmunoensayos específicos. La FSH estimuló la producción de E y P por el ovario (E= control: 516 ± 20 vs FSH: 1777 ± 25 pg/mg tejido; P= control: 170 ± 35 vs FSH: 584 ± 75 pg/mg tejido). El IGF-1 produjo un importante efecto sinérgico con FSH tanto en E (FSH+IGF-1: 4819 ± 89 pg/mg tej) como en P (FSH+IGF-1: 931 ± 45 pg/mg tej). Por otra parte, la IL1b revirtió el aumento de P producido por FSH (FSH+IL1b: 230 ± 25 pg/mg tej) mientras que la Lp disminuyó el efecto FSH+IGF-1 (E=FSH+IGF-1+Lp: 2422 ± 97 pg/mg tej; P=FSH+IGF-1+Lp: 680 ± 94 pg/mg tej). Estos resultados sugieren que 1) IGF-1, IL1b y Lp tendrían una acción regulatoria sobre la esteroidogénesis ovárica 2) la Lp y la IL1b actuarían inhibiendo la acción estimuladora de FSH sobre la esteroidogénesis ovárica. Es posible que la producción anormal de E y P por el ovario poliúístico sea debido a la alteración de los niveles de FSH, Lp e IL1b reportado en dicha patología.

127. Rantes: inmunomodulador de la respuesta semialogénica materna. Rosanna E. Ramhorst(1), Verónica García(1), Eduardo H. Chuluyan(1), Adriana Corigliano(2), Leonardo Fainboim(1).

(1)Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas «José de San Martín» y Cátedra de Microbiología (2)Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas «José de San Martín» <mailto:raramhorst@fmed.uba.ar>

La aloinmunización en mujeres con abortos recurrentes espontáneos (ARE) modula las interacciones quimocinas-receptor en las poblaciones CD8+ regulatorias. El objetivo del presente trabajo fue investigar el rol de las quimocinas en mujeres fértiles y con ARE. La determinación por ELISA de los niveles de RANTES, MIP-1alfa y MCP-1 presentes en el suero de mujeres con ARE y fértiles, evidenció una disminución significativa de los niveles de RANTES en mujeres con ARE respecto a mujeres fértiles ($p < 0.05$), mientras que no se encontraron diferencias en las demás quimocinas estudiadas. Por otra parte, como las pacientes con ARE también presentan disminuidos factores bloqueantes (FB) del cultivo mixto linfocitario (CML), se correlacionaron los niveles de FB del CML y la producción de RANTES, evidenciándose una asociación significativa entre ambos parámetros ($p < 0.01$). Asimismo, se estudiaron los niveles de quimocinas presentes en suero de mujeres con ARE que recibieron leucocitos paternos. Los resultados mostraron un aumento significativo de los niveles de RANTES, pero no de MIP y MCP-1, luego de la inmunoterapia ($p < 0.05$). Seguidamente, se investigó el efecto de la adición

exógena de RANTES al CML, lo cual inhibió la respuesta alogénica. Estos resultados muestran que RANTES podría ser uno de los FB del CML y sugieren la potencial utilización como parámetro predictivo del éxito o fracaso de un embarazo y para el seguimiento de mujeres con ARE.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES I

128. Estimulación hipotónica (EH) del transporte activo de Na⁺ en músculo esquelético: participación del citoesqueleto. Roque A. Venosa(1).

(1)Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Fac. de Cs. Médicas, UNLP
mailto: rvenosa@atlas.med.unlp.edu.ar

El propósito de estos experimentos es determinar el mecanismo por el cual la hipotonicidad incrementa el bombeo de Na⁺ y el número aparente de bombas (bNa) en músculo esquelético de rana (Venosa, BBA 510:378, 1978 y J. Membrane Biol 120:97, 1991), mediante mediciones de flujos iónicos y de fijación de ouabaina (fOUA). La EH ocurre al reducir la presión osmótica normal del medio (P1) a la mitad (P0.5) o, P2 (doble de la normal) a P1. En músculos equilibrados en P1 y con el bombeo de Na⁺ totalmente bloqueado por la presencia de [OUA] = 60 uM, la fOUA aumentó 42±11% cuando se cambió a P0.5 manteniendo [OUA] constante. Lo mismo ocurrió en el cambio de P2 a P1 (aumento: 46±9%). Esto sugiere que el aumento de la fOUA durante la EH representa un aumento real del número de bNas en el sarcolema. Dado el estiramiento hipotónico del sarcolema se está estudiando el rol del citoesqueleto en la EH. Los microtúbulos no estarían involucrados pero sí los microfilamentos (MF) ya que la latrunculina B (10 uM), potente despolimerizante de los MF (F-actina), redujo en un 72% el aumento del bombeo de Na⁺ producido por el cambio de P1 a P0.5 y en 79% y 91% los aumentos de la densidad de bNas producidos, respectivamente, por cambios de P1 a P0.5 y de P2 a P1. Conclusión: en la EH el aumento de volumen celular y la consecuente deformación del citoesqueleto produciría la inserción, mediada por MFs, de bNas en el sarcolema y el consiguiente incremento en el transporte activo de Na⁺.

129. Efectos de la ionomicina y thapsigargina sobre las corrientes iónicas en ovocitos de Bufo arenarum. Soledad M. Cavarra(1), Basilio A. Kotsias(1).

(1)Universidad Maimónides e Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA.
mailto:solemc@yahoo.com

El objetivo del trabajo es continuar la caracterización de las corrientes iónicas activadas por Ca en ovocitos de Bufo arenarum, con potencial controlado (2 microelectrodos). A partir de un potencial de base -60mV, se aplicaron pulsos hiper y despolarizantes de 3 seg de duración, desde -100mV hasta +60mV en pasos de 20mV. Los datos fueron registrados y analizados con el programa Pclamp. En solución ctrl la aplicación de ionomicina 1uM (ionóforo de Ca, IM) aumenta las corrientes iónicas salientes en 31.7% (SE 5.2), pulso +60mV; y las entrantes en 38.2% (SE 10.2), pulso -100mV, de manera significativa (p<0.05, n=9). En ovocitos pretratados con bapta-am 1uM (quelante intracelular de Ca) o con thapsigargina 10uM (inhibidor de la bomba de Ca del retículo sarcoplásmico), la IM no produjo cambios. En ovocitos incubados en una solución libre de Ca y con bapta 200uM (quelante extracelular de Ca), la aplicación de IM dió lugar a un aumento significativo (p<0.05, n=7) sólo para las corrientes entrantes del 32.3% (SE 19.5), pulso -100mV. Estos resultados sugieren la existencia de dos clases de canales activados por Ca: unos dependientes del Ca liberado del retículo sarcoplásmico, y otros activados por la entrada de Ca extracelular. El influjo de Ca es dependiente del aumento de la concentración de Ca citosólico. Datos preliminares basados en el cálculo del potencial de reversión sugerirían que se trata de canales de Cl.

130. Inhibición selectiva de las isoformas Adenilato Ciclasas por acción del Óxido Nítrico. Jorge Goldstein(1), Claudia Silberstein(2), Cristina Ibarra(2).

(1)Weizmann Institute of Science, Israel (2)Departamento de Fisiología, F. Medicina, UBA
mailto:jogol@fmed.uba.ar

Las diferentes isoformas Adenilato Ciclasas (ACs) catalizan la síntesis de AMP cíclico 3', 5', a partir de ATP. Estas isoformas están críticamente involucradas en la regulación de la transcripción génica, el metabolismo, y la actividad de canales iónicos, entre otras funciones. Por otra parte, el Óxido Nítrico (NO) es un producto gaseoso sintetizado a partir de L-arginina por la enzima NO sintasa. Es muy conocido el efecto activador de NO en la enzima Guanilato Ciclasa, pero escasamente se ha informado de los efectos del NO en otro importante segundo mensajero, como la AC. En el presente estudio evaluamos los efectos del Nitroprusiato de Sodio (SNP), un compuesto liberador de NO en células COS-7 transfectadas con diferentes plásmidos que contenían las isoformas génicas AC I, II, V y VI. Observamos una inhibición total (~98.5%) en la producción de AMPc en las células COS-7 transfectadas con la isoforma AC I previamente tratadas con SNP (10 mM) por 30 minutos cuando se las estimuló con lonomicina. También observamos una alta inhibición en la producción de AMPc (~76%) en las células COS-7 cuando se las transfecó con la isoforma AC VI previamente tratadas con SNP (10 mM) por 30 minutos cuando se las estimuló con Forskolina. No encontramos variaciones significativas en la producción de AMPc en las células transfectadas con las isoformas Ac II y V. Proponemos una inhibición selectiva en la producción de AMPc de las diferentes isoformas de Acs estudiadas por acción del SNP.

131. Mecanismo de acción de la adenosina sobre los canales de calcio voltaje dependiente (VDCC) tipo L. Mariela I. Veggetti(1), Silvana De Lorenzo(1), Salomón Muchnik(1), Adriana S. Losavio(1).

(1)Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari
mailto: alosavio@mail.retina.ar

En trabajos anteriores encontramos que en sinapsis neuromuscular de mamífero, la activación de los receptores [R] A1 de adenosina induce inhibición presináptica de la liberación espontánea de ACh, debido a una disminución de la corriente de Ca_v2+ por los CCVD tipo L. Sin embargo, el mecanismo por el cual ejerce esta acción no está aclarado. Nuestro propósito fue investigar si el efecto de CCPA, un agonista específico de los RA1, se debe a una inhibición de PKA o PKC a través de la proteína Gi/o o Gq, respectivamente, o a un efecto directo de la subunidad bg de la proteína G sobre la subunidad a1 del CCVD tipo L. Para ello se estudió el efecto de CCPA 100mM, en hemidiafragmas de ratones CF1, sobre la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPPs) en preparaciones previamente incubadas con inhibidores de la PKA (Rp-cAMP 50mM) o PKC (H-7 10mM). CCPA redujo la fMEPPs 46.6±5.8%, n=6 con respecto a los controles. Cuando CCPA fue aplicada luego de la incubación con Rp-cAMP no se observó modificaciones del porcentaje de inhibición (44.9±3.1%, n=3), sugiriendo que CCPA no utiliza la vía de inhibición cAMP-PKA. CCPA tampoco indujo una disminución significativa de la modulación presináptica cuando fue estudiada luego de la incubación con H-7 (44.5±4.1%, n=5). Estos resultados sugieren que CCPA induciría una inhibición de los CCVD tipo L por una acción directa de la subunidad bg de la proteína G sobre la subunidad a1 del canal, sin mediar segundos mensajeros.

132. Control parasimpático del metabolismo de arginina en células presentadoras de antígeno de portadores de tumor.. Eulalia de la Torre(1), Alejandro J. Español(1), Lilia E. Davel(1), María A. Jasnís(1), Eugenia S. de Lustig(1), María E. Sales(1).

(1)Instituto de Oncología Angel Roffo
mailto:eulaliadelatorre@hotmail.com

Es poco conocida la participación del Sistema Nervioso Autónomo parasimpático (SNAp) en la respuesta inmune antitumoral. Caracterizamos la regulación que el SNAp ejerce sobre metabolización de arginina vía óxido nítrico sintasa (NOS) y arginasa, en MFs peritoneales de ratones con 7 días de portación de la línea tumoral LMM3 (MfsT). Observamos que MFs normales metabolizan arginina vía NOS produciendo citrulina y NO (mM NO₂-/106 cel.) (126±11) (n=9) y expresan las isoformas iNOS y nNOS (DO/mm²) (0,323 y 0,141). También poseen actividad de arginasa dando ornitina y urea (mM de urea/106 cel.) (74,4±6,5) (n=7). La estimulación con carbacol 10-7M, incrementó la producción de NO (163,8±7,8) (n=5) y la actividad basal de arginasa (241,8±14,3) (n=7) siendo ambos efectos bloqueados por atropina (AT) 10-5 M. La portación de tumor disminuyó la producción de NO (89,9±10,9; n=8) así como la expresión de iNOS (0,243) y nNOS (0,058) y aumentó la producción de urea por arginasa (419,3±18,2; n=8). En MfsT el carbacol sólo estimuló la actividad de arginasa (1353,3±62) (n=4) efecto bloqueado por AT. La disminución de la producción de NO concomitante con el aumento en la producción de urea en MFsT indicaría la presencia en el peritoneo de células capaces de proliferar y promover la proliferación tumoral a través de las poliaminas sintetizadas vía arginasa. La respuesta muscarínica de los MFs activaría estos mecanismos durante estadios tempranos de portación tumoral.

- 133. Efecto de la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH, sobre la producción de AMPc en células ováricas tumorales y de prepúberes superovuladas (SPO).** Astrid Chamson-Reig(1), Victoria A.R. Lux-Lantos(1), Paolo N. Catalano(1), Omar P. Pignataro(1), Carlos Libertun(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental
mailto:achamson@dna.uba.ar

Demostamos que el GnRH ejerce efectos en células de tumores ováricos intraesplénicos (T) sin involucrar la activación de fosfolipasa C. Dado que el GnRH también se acopla a la proteína Gs modulando los niveles de AMPc, evaluamos el efecto de busserelina (B), análogo de GnRH, sobre la producción de AMPc en cultivos de T y de SPO. Las células se cultivaron durante 7 días (Endocrinology 140:3573-3580:1999). AMPc se determinó por RIA. En T, B (100 y 1000 ng/ml) estimuló concentración dependiente la producción de AMPc [(% control) (C): C: 100±4, B (100): 171±24, B (1000):256±74; p<0.05]; en SPO sólo B (100 ng/ml) estimuló la producción de AMPc [(% control): C: 100±2, B (100): 141±12, B (1000):112±15; p<0.05]. En T, hCG (1.10-9M) indujo un aumento de AMPc mayor que B y la coincubación de hCG y B inhibió el efecto de hCG. En SPO, los efectos de B y hCG fueron similares y la coincubación no modificó el efecto de hCG. Toxina Pertussis, que inhibe la proteína Gi/0, sólo indujo un aumento de AMPc en T y no modificó el efecto de B en T ó SPO. Concluimos que el receptor de GnRH estimula la producción de AMPc en células ováricas tanto tumorales como SPO. Las tumorales responden a concentraciones altas de B, a las que las SPO son insensibles, y en T, B inhibe la producción de AMPc inducida por hCG. En las células tumorales habría una proteína Gi/0 activada inhibiendo basalmente la adenilato ciclasa. Realizado con el apoyo de CONICET-UBA-Ministerio de Salud de la Nación.

- 134. Regulación de la transducción de señales por cascadas de MAPKs: c-Fos como sustrato de la novel MAPK Erk6.** Tamara Tanos(1), Federico Coluccio-Leskow(1), Daniel Hochbaum(1), Omar A. Coso(1).

(1)Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. FCEyN. UBA. Argentina

Uno de los los mecanismos de transducción de señales mas estudiados ultimamente son las cascadas de MAPKs. Estas aparecen vinculadas a procesos de regulación de la proliferación o diferenciación celular así como a la muerte celular programada. Algunas de estas cascadas estan mejor caracterizadas, como las que involucran a Erk1/2 o a JNK, mientras que de otras MAPKs nóveles como Erk5, Erk6, p38 y Sapk4 aún se conoce muy poco,

tanto respecto de sus reguladores como de sus sustratos. Con el objetivo de explorar la existencia de proteínas que contibuyan a la regulación de la actividad o a la propagacion de la señal que Erk6 transduce, rastreamos una biblioteca de DNA-copia de celulas HeLa utilizando doble hibrido de levaduras, con Erk6 como carnada. Como resultado de este análisis, logramos levantar varios clones de cDNA que incluyen un factor de transcripción de la familia AP-1, c-Fos, y una proteína actualmente poco caracterizada, DJ1. Aquí reportamos que ensayos de fosforilación 'in vitro' muestran que la proteína c-Fos expresada tanto en bacterias como en células eucariontes es sustrato de Erk6 mientras que DJ1 no lo es pese a que tanto la interacción Erk6-Fos como Erk6-DJ1 resisten los controles de especificidad en levaduras. La fosforilación de c-Fos por MAPKs ha sido sospechada por años pero este seria el primer reporte que muestra a c-Fos como sustrato específico de una MAPK concreta, Erk6. Realizamos además un ensayo comparativo de fosforilación de c-Fos por otras MAPKs.

COMUNICACIONES ORALES

ENDOCRINOLOGÍA III

- 135. La inhibición de fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) por wortmanina y Ly294002 disminuye la respuesta esteroideogénica a hCG en células de Leydig de rata.** Eliana H. Pellizzari(1), Silvana B. Meroni(1), María F. Riera(1), Selva B. Cigorraga(1).

(1)Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños R. Gutiérrez. Buenos Aires. Argentina.
epellizzari@cedie.org.ar

El mecanismo de acción clásico de LH en células de Leydig (CL) involucra como efector la adenilil ciclasa con la consiguiente elevación de los niveles de cAMP y la activación de pKa. Existen cada vez más evidencias en la literatura de hormonas que utilizan más de un sistema efector para propagar la señal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la posible participación de la activación de PI3K en la estimulación por hCG de la producción de testosterona (T) en CL. Las células se incubaron por tres horas en condiciones basales y bajo estímulo con hCG (hCG-CR-127, 10ng/ml) en presencia o ausencia de wortmanina (W: 10microM) y Ly294002 (LY: 100microM) -inhibidores de PI3K. Mientras que ambos inhibidores no modifican la producción de T en condiciones basales, estas drogas inhiben parcialmente la producción de T estimulada por hCG (hCG: 49,6±6,5a; hCG+W: 32,5±9,0b, hCG+Ly: 9,9±1,5c, ng/millón de células, media±DS, n=3, diferentes letras indican diferencias significativas p<0,05). W y Ly también inhiben la producción de T estimulada con un análogo del AMPc (dbAMPc, 1mM) (dbAMPc: 43,3±6,8a; dbAMPc+W: 26,7±8,4b; dbAMPc+Ly: 10,3±2,5c). Los resultados obtenidos sugieren que en el mecanismo por el cual hCG estimula la producción de T en CL participa la activación de PI3K y que dicha activación es importante en eventos posteriores a la elevación del AMPc.

- 136. Participación de la activación de fosfatidilinositol-3-kinasa y proteína kinasa B (PI3K y pKb) en el mecanismo de acción de FSH en células de Sertoli de rata.** Silvana B. Meroni(1), María F. Riera(1), Eliana H. Pellizzari(1), Selva B. Cigorraga(1).

(1)Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños R Gutiérrez. Buenos Aires. Argentina
mailto:smeroni@cedie.org.ar

El mecanismo de acción clásico de FSH en células de Sertoli involucra el aumento en los niveles de AMPc y la activación de pKa. El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de la activación de PI3K y pKb en el mecanismo de acción de FSH en dichas células. Se utilizaron cultivos de células de Sertoli de 20

días de edad estimulados con FSH en ausencia o presencia de H89 (inhibidor de PKA), wortmanina y Ly294002 (W y Ly, inhibidores de PI3K). Los resultados se expresan como ng transferrina/microg DNA, media±DS, n=3, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). La estimulación por FSH de la producción de transferrina no fue revertida totalmente en presencia de H89 (Basal: 44.8±6.5a, FSH: 96.1±4.4b, FSH+H89: 79.3±6.4c). W y Ly inhibieron parcialmente la habilidad de FSH para estimular la producción de transferrina (Basal: 67.4±5.7a, FSH: 165.3±3.3b, FSH+W: 83.1±5.7c y FSH+Ly: 84.1±8.2c). Asimismo se demostró, por análisis de Western blot, que FSH aumenta los niveles de pKb fosforilada a los 60 minutos de estímulo. Dicha estimulación no se observó en incubaciones en presencia de los inhibidores de PI3K. Resultados semejantes se obtuvieron cuando las células se estimularon con un análogo del AMPc. En conjunto estos resultados sugieren que el mecanismo de acción de FSH en células de Sertoli involucra además de la vía clásica AMPc-pkA y post-formación del nucleótido cíclico, la activación de PI3K y pKb.

137. Regulación hormonal de la producción de inhibinas y activina A en túbulos seminíferos humanos. Romina V. Trigo(1), Eliana H. Pellizzari(1), Nigel P. Groome(2), Silvia Gottlieb(1), Selva B. Cigorraga(1), Stella Campo(1).

(1)Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina (2)Oxford Brookes University, Oxford, Inglaterra
mailto: rtrigo@cedie.guti.gov.ar

Las inhibinas y activinas son producidas por células gonadales; altos niveles de estos péptidos se han observado en circulación en varones luego del nacimiento. El objetivo de este trabajo fue estudiar la producción 'in vitro' de inhibinas (Pro-alfa-C, Inh B e Inh A) y activina A (Act A) en células testiculares provenientes de un paciente de 1 mes de vida con insensibilidad parcial a los andrógenos. Las células intersticiales (CI) y los túbulos seminíferos (TS) fueron obtenidos por digestión enzimática. Las CI se cultivaron por 48 hs y se conservó el medio condicionado (MCCI). Los TS se cultivaron por 8 días. En los días 4 y 6 de cultivo se agregó: FSH (100ng/ml), FSH+IGF-I (50ng/ml), Act A (50ng/ml), testosterona (50nM), FSH+TGF-beta (1ng/ml), IL-1beta (30ng/ml), TNF-alfa (20ng/ml) y MCCI. Se determinaron por Elisa Pro-alfa-C, Inh B, Inh A y Act A. La producción de Pro-alfa-C no fue estimulada en las condiciones estudiadas. TNF-alfa disminuyó (41.6±1.9 vs 15.1±0.7ng/ml; $p < 0.001$) y MCCI estimuló (70±1.4ng/ml; $p < 0.001$) la producción de Inh B. IL-1beta y TNF-alfa estimularon: la producción de Inh A (4±1.5 vs 53.5±6.2 y 79.4±4.8pg/ml; $p < 0.001$ respectivamente) y de Act A (4.5±0.7 vs 10.5±0.4 y 5.8±0.7ng/ml; $p < 0.05$ respectivamente). Los resultados muestran que en el período postnatal las inhibinas y Act A son producidas en el TS independientemente de FSH. La regulación de estos péptidos estaría ejercida por citoquinas y factores producidos por células intersticiales.

138. Rol de la glicoproteína gp130 en la regulación de los tumores hipofisarios. Carolina Perez Castro(1), Alberto Carbia Nagashima(1), Damiana Giacomini(1), Marcelo Paez Pereda(2), Renner Ulrich(2), Gunter Stalla(2), Eduardo Arzt(1).

(1)Lab. Fisiología y Biología Molecular. FCEyN. UBA.
(2)Instituto Max-Planck, Munich, Alemania
mailto:acarbia@bg.fcen.uba.ar

Hemos demostrado que citoquinas que usan el transductor de señales gp130, son factores patogénicos en hipófisis. Generamos clones estables de células tumorales lactosomatotrofas GH3 (transfección), que sobreexpresan la proteína gp130 (clones sense), clones de expresión inhibida (antisense) y clones wt (vector vacío). La proliferación (WST-1; Abs: 450nm) de las células frente a CNTF, citoquina gp130, reveló que los clones antisense poseen suprimida la respuesta a CNTF (2nM) y responden a TRH (100nM) (clones antisense: basal=b: 0.146 ± 0.015 vs CNTF 0.182 ± 0.02

vs TRH 0.398 ± 0.044 $p < 0.01$ b vs TRH), sin encontrarse diferencias entre los clones sense y WT que responden tanto a CNTF como a TRH (wt b: 0.161 ± 0.031, CNTF 0.249 ± 0.016, $p < 0.05$, TRH 0.393 ± 0.017, $p < 0.01$, respecto del b; clones sense: b: 0.145 ± 0.034, CNTF 0.261 ± 0.02, $p < 0.05$, TRH 0.393 ± 0.017, $p < 0.01$ respecto del b). Un patrón similar de respuesta se observó en la producción de PRL y GH (RIA), siendo que los clones antisense tienen una menor secreción basal y de respuesta a CNTF y una respuesta normal a TRH y GHRH. La formación de tumores en ratones nude, mostró que células wt y clones sense generan tumores in vivo (39-1125 mm³ y 50-1800 mm³), mientras que clones antisense, exhiben un retardo temporal y volúmenes menores (4.8-400 mm³). A través de su bloqueo, demostramos que la expresión de gp130 es clave para la generación de tumores in vivo por células hipofisarias tumorales. Subsidado: Volkswagen I/76 80

139. Efecto de la GH sobre la proporción antropométrica hueso/músculo en hombres y mujeres panhipo-pituitarios.

Haraldo Claus-Hermsberg(1), H Fideleff(1), A Chervin(1), G Stalldecker(1), I Sinay(1), P Sobrado(1), Gustavo R. COUNTRY(2), José L. Ferretti(2).

(1)Grupo KIMS, Buenos Aires (2)Centro de Estudios de Metabolismo Fosfo-cálcico
jiferretti@arnet.com.ar

Para estudiar los efectos músculo-esqueléticos de la GH, analizamos las relaciones densitométricas entre las masas mineral y magra del cuerpo (MM, LM) en 14 hombres y 15 mujeres de 23-60 años con déficit de GH (AGHD), antes y después de 12-18 meses de reemplazo terapéutico, y en 600 hombres y mujeres post-menopáusicas de edad similar. Las correlaciones entre MM y LM (siempre $p < 0.001$) en pre- y post-tratados fueron similares al control. El tratamiento aumentó MM y LM correlativamente en ambos sexos, sin afectar las ordenadas al origen de las curvas (ANCOVA n.s.). Este efecto fue mucho más evidente cuando se restringieron las mediciones a los miembros inferiores. El bajo número de casos impidió detectar una eventual interacción del estado estrogénico natural o terapéutico sobre ese comportamiento. Asumiendo que la LM representa la masa muscular, esto sugiere que tanto hombres como mujeres con AGHD mostraron relaciones músculo/hueso dentro de lo normal, tanto antes como después del tratamiento sustitutivo con GH. El tratamiento habría resultado útil para aumentar las masas ósea y muscular siguiendo las proporciones fisiológicas, aunque poco o nada efectivo para mejorar esa proporcionalidad. Si así fuera, esto constituiría la primera evidencia de que la GH actúa anabólicamente sobre músculos y huesos sin interactuar, positiva ni negativamente, con la regulación de la estructura (e indirectamente de la masa mineral) esquelética a cargo del 'mecanostato' óseo de Frost.

140. Expresión de las distintas isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS) en células de la corteza adrenal. Cecilia Colonna(1), Cora B. Cymeryng(1), Luciana Gadda(1), Ernesto J. Podestá(1).

(1)Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA.

mailto:ccolonna@fmed.uba.ar

Recientemente hemos demostrado la expresión de las isoformas endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) en la zona fasciculata (ZF) adrenal de rata y de la isoforma eNOS en una línea celular adrenocortical murina (Y1). El objetivo del presente trabajo fue determinar la localización celular y subcelular de estas isoformas y analizar su interacción con otras proteínas. El análisis por Western blot de las fracciones subcelulares de ZF adrenal demostró la expresión de eNOS en membranas y de nNOS en citosol y microsomas. Los estudios de inmunofluorescencia indicaron la presencia de nNOS tanto en fibras nerviosas de corteza y médula, como en las propias células esteroideogénicas. La eNOS fue detectada en la corteza adrenal. En las células Y1 se detectó la eNOS en las fracciones microsomal y nuclear tanto por

Western blot como por inmunocitoquímica. En éste caso, el agregado de un péptido competidor de eNOS desplazó la señal de ambas fracciones. La tinción de Hoechst confirmó la localización nuclear. Se detectó actividad de conversión de L-[3H]-Arginina a L-[3H]-Citrulina en ambas fracciones. Los experimentos de inmunoprecipitación demostraron la interacción de nNOS con la proteína Hsp 90 y con caveolina 1 (proteína integral de la caveola) indicando la posible formación de un complejo involucrado en la regulación de la actividad de NOS. En conclusión, los resultados presentados confirman la expresión de las isoformas constitutivas en las células esteroideogénicas de la corteza adrenal.

- 141. Efecto del estradiol sobre la función adipocitaria.** Judith Piermaría(1), Mario Perelló(1), Gloria Cónsole(2), Lucas A. Mongiat(3), Griselda Moreno(1), Rolf C. Gaillard(4), Eduardo Spinedi(1).

(1)Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, La Plata
(2)Facultad de Medicina, La Plata (3)Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires (4)Hospital Universitario de Lausanne, Suiza
mailto:esimbi@netverk.com.ar

El rol modulador de los esteroides sexuales sobre el control alimentario ha sido sugerido por la literatura internacional. En este estudio evaluamos el efecto del valerato de estradiol (VE;2mg/rata,im), en la rata hembra adulta, sobre varios parámetros a los 60 días post-VE. El tratamiento con VE: a) interrumpió el ciclo estral, desarrollándose ovarios atroficos y carentes de cuerpos lúteos, b) disminuyó el aumento del peso corporal, y c) indujo hiperestrogenemia, hiperprolactinemia y disminución de LH circulante; sin embargo, no alteró los niveles plasmáticos de leptina en animales alimentados ad libitum (5, 11±0.83 en VE vs 3,78±0.65 ng/ml en controles, CT). El ayuno de 24 hs indujo una significativa caída de leptina circulante en el grupo CT (0,91±0,05 ng/ml, p<0,01 vs CT ad libitum) aunque no en el VE (3,38±0,84 ng/ml, p>0,05 vs VE ad libitum). Luego de la disección de grasa abdominal, se realizó una dispersión enzimática de adipocitos; los resultados indicaron una mayor número de adipocitos en el grupo VE (5,8x106/g) respecto al CT (3,3x106/g). Nuestro estudio revela un claro efecto del estradiol en la regulación del peso corporal; los probables mecanismos de acción podrían involucrar un aumento compensatorio de la masa grasa corporal y, como consecuencia, de la reserva de leptina endógena. Potenciales cambios bioquímicos inducidos por estradiol y/o prolactina sobre la sensibilidad central a la leptina y la fisiología adipocitaria requiere posteriores estudios.

NEFROLOGÍA I

- 142. Dependencia de la presión sanguínea con el sistema Kalikreina Kinina (SKK) en ratas hembra con masa renal reducida.** Fernando R. Ibarra(1), Elisabet M. Oddo(1), Leonard F. Obika(2), Rodolfo S. Martín(1), Juan A. Barcat(1), Elvira E. Arrizurieta(1).

(1)Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, UBA.
(2)Benin City University, Benin, Nigeria.
mailto:ilanari@pinos.com

Al reducir la masa renal el crecimiento renal compensador (CRC) y el filtrado glomerular (FG) parecen variar según sexo. Para investigar el rol de las hormonas sexuales y el SKK en el mantenimiento de la presión sanguínea, se estudiaron ratas Wistar, intactas y uninefrectomizadas (uNx) a los 3 meses de edad, macho, hembra y hembras ovariectomizadas (oVx) a los 60 días (d) de vida. Grupos similares recibieron aprotinina, inhibidor de kalikreina, por 4d antes de la evaluación del FG. A los 150d de vida se coleccionó orina de 24hs para medir excreción de kalikreina (KU). Luego se evaluó el FG, presión arterial media (PAM), peso corporal y renal. En ratas hembras (H) el peso del riñón remanente (g/100g PC) alcanzó un 68% con respecto a su control con masa renal intacta. En los machos uNx (MuNx) y oVx

uNx fue un 77% y 79%, respectivamente. El FG (ml/min/100g PC) de HuNx, MuNx y oVxuNx fue de 47%,65% y 102% respectivamente. El riñón del MuNx no incrementó la KU como el riñón de ratas hembras uNx con o sin oVx (nkat/d/100g PC)10.28±1.90 vs 22.38±3.08 p<0.01; 26.32±2.06 vs 31.06±4.66 NS, 16.79±3.61 vs 27.03±2.65 p<0.05). La PAM, normal en todos los grupos, se incrementó al inhibir el SKK solo en uNx hembras, ovariectomizadas o no: 113.7±5.5 vs 131.6±4.4 y 100.0±7.7 vs 135±7.0 mmHg respectivamente. En estas ratas la KU y la PAM se correlacionaron en forma inversa (r: 0.61 p< 0.02).En ratas hembras con masa renal reducida, la presión sanguínea parece depender en parte del SKK.

- 143. La actividad de la monoaminoxidasa (MAO) renal es influenciada por la ingesta de sodio.** Verónica A. De Luca Sarobe(1), Andrea Carranza(2), Adriana R. Scerbo(1), Marta B. Barontini(2), Elvira E. Arrizurieta(1), Fernando R. Ibarra(1).

(1)Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari, U.B.A. (2)CEDIE, Hospital de Niños R. Gutierrez
mailto:verodeluca@netizen.com.ar

La dopamina(DA) intrarrenal es metabolizada por diferentes enzimas a lo largo del nefrón, sugiriendo una regulación específica del metabolismo. Para estudiarlo, ratas Wistar recibieron dietas con diferente sodio: Normal(N), hiposódica(SB), hipersódica(SA) por 5 ds, determinándose en orina: L-dopa, DA, ác. dihidroxifenilacético (DOPAC), Na+ y volumen(v) a lo largo del estudio y al 5° día: filtrado glomerular (FG) y aldosterona plasmática (Aldo). En los días 1 y 5 (d1 y d5) se determinó MAO en corteza (C) renal y médula (M). El Na+(mEq/d), igual que el v(ml/d), fue mayor en SA 8.2±1.22, 34.9±6.87 y menor en SB 0.04±0.01, 6.8±0.59 que en N 0.2±0.05, 8.9±0.82 (p<0.05). Aldo (ng/ml): SB 1061.8±231.14, SA 133.1±31.72, N 283.9(N vs SA p<0.025, N vs SB p<0.01). FG(ml/min/100g pc): SB 0.69±0.06 vs SA 0.49±0.02, p<0.05. La DA fue más alta en SA 4050.5±833.52, que en SB 1786.2±140.49, p<0.025. La relación DOPAC/DA en el d1 fue en SA 2.03 y en SB 1.76, mientras que en el d4 fue en SA 0.78 y en SB 3.92. MAO renal (mmol/mg/h): fue mayor en C que en M. MAO basal en C normal 15.4±0.53 y en M 10.5±1.2, p<0.001; al d1 en C SA 14.5±0.57, y en SB 12.1±0.41, p<0.01, sin diferencias en M. Al d5 la MAO tendió a disminuir en C de SA (13.1±0.66) y aumentó en C de SB a 14.5±0.34 y en M, 9.2±1.4 vs d1 5.9±0.31, p<0.025. Conclusión: el contenido de Na+ en la dieta podría influir la actividad de MAO a nivel renal, siendo más evidente en la dieta hiposódica donde su mayor actividad conduce a la mayor producción del metabolito inactivo de DA.

- 144. Diferencias en la regulación de la Na+, K+ ATPasa (NKA) por fosforilación en el túbulo proximal (TP) y en el asa gruesa de Henle (AGH).** Claudia A. Bertuccio(1), Rodolfo S. Martín(1), Elvira E. Arrizurieta(1), Fernando R. Ibarra(1).

(1)Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari, U.B.A.
mailto:ilanari@pinos.com

La actividad de la bomba de sodio en el AGH es mayor que en el TP. Objetivo: investigar si la diferencia en la actividad podría ser debida a una distinta regulación de la NKA por fosforilación en el sitio de PKC. Se utilizaron membranas corticales y medulares para liberación de 32P y segmentos microdisecados de TP y AGH para Western blot. La fosforilación de la NKA fue medida con el anticuerpo (Ac)McK1 que reconoce la Ser23 de la subunidad alfa-1 cuando se halla defosforilada. Esto fue comparado con un Ac común que reconoce a la NKA independientemente de su estado de fosforilación. La actividad de la NKA fue mayor en membranas de AGH que en TP (µmol Pi/mgprot/h 34.2±8.9 vs 9.2±1.2, p<0.05). La NKA basal en AGH se encontró más defosforilada que en TP (13.43±1.99 vs 2.30±0.14 UD). Con el Ac común no se encontraron diferencias en la expresión de la NKA entre TP y AGH. Ro 31 8220 10-6M, inhibidor específico de PKC, aumentó la señal en TP sin cambiar la del AGH. Contrariamente, un inhibidor de la fosfatasa 2B, calcineurina, FK 506 10-6M, no cambió la densi-

dad en TP y en cambio redujo marcadamente la de AGH. Dopamina (DA)10-6M, que estimula PKC, redujo la señal en AGH de 17.2 ± 2.06 a 10.5 ± 1.80 UD ($p < 0.05$). Este efecto fue bloqueado por Ro 10-6M (16.00 ± 1.92 UD). Los resultados muestran que la NKA es regulada en forma diferente en el TP y AGH por fosforilación. La NKA basal en el AGH está más defosforilada, lo que explicaría su mayor actividad en este segmento donde la reabsorción es contra gradiente osmótico.

145. Regulación de la captación de L-dopa por la insulina en células del túbulo proximal renal. María A. Carranza(1), Carlos F. Mendez(2), Marta B. Barontini(1), Susana Nowicki(1).

(1)Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), CONICET (2)Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA
mailto:nowickisusana@hotmail.com

La dopamina renal es producida en el túbulo proximal (TP) a partir del aminoácido L-dopa (LD). Dado que la insulina (INS) estimula la captación de aminoácidos, nos propusimos estudiar el efecto de la INS sobre el transporte de LD por células del TP (células de rata aisladas y cultivos de LLCPK). La acumulación intracelular de LD (medida por HPLC-ED) se usó como parámetro para medir su transporte. La INS (en concentraciones fisiológicas) estimuló la captación de LD ($155 \pm 22\%$ del control). El curso temporal mostró que este efecto es rápido (2-5 min), y se manifiesta sólo sobre el transportador de LD de alta afinidad (Km 316 nM) sin afectar el sitio de baja afinidad. Del análisis de Scatchard surge que la INS aumenta el Vmax de los sitios de alta afinidad (41% sobre el control) sin modificar el Km. La INS revirtió la inhibición de la captación de LD por el agonista beta2 terbutalina (TER) (respecto del control TER 56 ± 9 ; INS 144 ± 8 ; TER+INS 108 ± 28). La INS disminuyó la captación de LD por células aisladas de animales diabéticos (modelo de estreptozotocina) (65% del basal), pero no de animales insulino resistentes (IR) (sobrecarga de fructosa). La expresión del receptor de insulina (respecto del control) fue mayor en animales diabéticos ($150 \pm 18\%$) y menor en animales IR ($33 \pm 6\%$). La INS aumenta la captación de LD en el túbulo proximal aumentando el número de transportadores de alta afinidad en células aisladas de ratas controles pero no de ratas diabéticas ó insulino resistentes

146. Depuración de aniones orgánicos en un modelo de calcificación distrófica en ratas. Mecanismos involucrados. Nora B. Quaglia(1), Anabel Brandoni(1), Adriana M. Torres(2).

(1)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Univ. Nacional de Rosario. CONICET
mailto:adtortes@fbioyf.unr.edu.ar

Este trabajo tiene por objetivo evaluar los mecanismos involucrados en la depuración de sulfanilamida (SA, anión orgánico modelo que se elimina preferentemente por vía renal) en ratas con calcificación distrófica. Se usaron ratas controles (C) y tratadas con una dosis de vitamina D3 (300000 UI/kg p.c., i.m. 5 días antes del experimento, T). Se midieron: niveles de calcio en aorta (Caa umol/g), presión arterial, perfil lipídico en plasma, calcemia, clearance renal de SA (Clr SA, ml/min/100 g), velocidad de filtración glomerular (VFG, ml/min/100g), flujo sanguíneo renal (FSR, ml/min/100 g), expresión del transportador renal de aniones orgánicos (OAT1) en membranas basolaterales, y parámetros farmacocinéticos de SA. Resultados: Caa: C = 26.2 ± 2.4 (n = 7), T = 35.7 ± 5.6 (n = 4), $p < 0.05$; Presión arterial sistólica (mm Hg): C: 96 ± 3 (n = 9), T = 158 ± 7 (n = 12), $p < 0.05$; ClrSA: C = 0.214 ± 0.023 (n = 6), T = 0.150 ± 0.011 (n = 7), $p < 0.05$; VFG: C = 0.733 ± 0.067 (n = 6), T = 0.610 ± 0.025 (n = 7); FSR: C = 5.32 ± 0.75 (n = 7), T = 3.29 ± 0.33 (n = 5), $p < 0.05$. No se observaron modificaciones en el perfil lipídico ni en la calcemia. La expresión de OAT1 aumentó en las ratas tratadas. Conclusión: las ratas con

calcificación distrófica muestran una disminución del ClrSA, a consecuencia de las modificaciones observadas en el FSR y en la VFG. El aumento de expresión de OAT1 compensaría, en parte, los efectos de la disminución del FSR sobre el ClrSA.

147. Diferencia ligada al sexo en la expresión del cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2) en ratas. Anabel Brandoni(1), Nora B. Quaglia(1), Adriana M. Torres(2).

(1)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Univ. Nacional de Rosario. CONICET.
mailto:adtortes@fbioyf.unr.edu.ar

La furosemida es un conocido diurético que ejerce su acción mediante la inhibición del cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2) presente en el asa ascendente de Henle. Hemos descripto que existe una diferencia ligada al sexo en la farmacodinamia de la furosemida en ratas. En las hembras se observó una mayor excreción de sodio, potasio y agua frente a idénticas cargas excretadas de furosemida en comparación con los machos. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar si existe una diferencia ligada al sexo en la expresión de NKCC2. Se trabajó con homogenados de corteza y médula de riñones provenientes de ratas Wistar adultas machos (n = 4) y hembras (n = 4). Se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%, luego se realizó una transferencia sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpo antiNKCC2 y el revelado se realizó con un kit comercial (4-optiCN, amplificado, BioRad). La expresión de NKCC2 no mostró diferencias ligadas al sexo en los homogenados de corteza renal. Por el contrario, las hembras mostraron una disminución del 30% en la expresión de NKCC2 con respecto a los machos en los homogenados de médula renal. Podemos concluir que la menor expresión de NKCC2 en el segmento medular del asa ascendente de Henle explicaría, al menos en parte, la mayor respuesta diurética, natriurética y calurética a la furosemida observada en ratas hembras.

148. Depuración de aniones orgánicos en ratas con ligadura de colédoco. Rol de la proteína transportadora renal de aniones orgánicos (OAT1). Anabel Brandoni(1), Nora B. Quaglia(1), Adriana M. Torres(2).

(1)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Univ. Nacional de Rosario. CONICET
mailto:adtortes@fbioyf.unr.edu.ar

Se ha descripto que la colestasis puede ocasionar modificaciones en la función renal. Existe poca bibliografía respecto de la expresión y funcionalidad de transportadores renales de aniones orgánicos en este tipo de patología. Objetivos: determinar la expresión de la proteína transportadora de aniones orgánicos (OAT1) en corteza renal y evaluar su funcionalidad en la depuración de p-aminohipurato (PAH) en un modelo de colestasis extrahepática en ratas. Se trabajó con ratas Wistar macho adultas con ligadura de colédoco durante 21 horas (L, n = 4) y con un grupo sham (S, n = 6). Se determinaron: Bilirrubina Total y Directa en plasma (BT y BD, mg/l) y uremia (U, g/l) por espectrofotometría, expresión de OAT1 en homogenados de corteza renal empleando la técnica de Western Blot, depuración sistémica de PAH (Ds PAH, ml/min/100 g) y cantidad de PAH excretada en orina durante 15 minutos (QPAHu, mg) luego de una dosis única de PAH (30 mg/kg p.c., i.v.). Resultados: BT: S = 5.3 ± 0.4 , L = 44 ± 2 , $p < 0.05$; BD: S = 2.3 ± 0.15 , L = 34 ± 1 , $p < 0.05$; U: S = 0.40 ± 0.1 , L = 0.45 ± 0.04 ; DsPAH: S = 2.82 ± 0.22 , L = 3.55 ± 0.06 , $p < 0.05$; QPAHu: S = 2.9 ± 0.1 , L = 3.7 ± 0.3 , $p < 0.05$. Se observó expresión aumentada de OAT1 en L. Conclusiones: Las ratas con ligadura de colédoco mostraron un aumento en la depuración sistémica de PAH con el correspondiente incremento en la excreción urinaria del anión, lo cual se podría explicar, al menos en parte, por el aumento en la expresión de OAT1.

149. Actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) renal en la expansión de volumen extracelular y su relación con la dopamina (DA) renal. Cristina T. Arranz(1), Rosana Elesgaray(1), María A. González(1), Analía Loria(1), Ana M. Balaszczuk(1), María A. Costa(1).

(1)Cat.Fisiología. Fac. Farmacia y Bioquímica. UBA. IQUIMEFA-CONICET.
mailto:carranz@ffy.uba.ar

En estudios previos mostramos que el sistema del NO está involucrado en los mecanismos de adaptación renal durante la expansión extracelular. Otro de los sistemas que se activa en ese estado es el dopaminérgico renal. El objetivo de este trabajo fue investigar la posible interacción entre ambos sistemas. Se midió la actividad de NOS con L-[U14C]-arginina como sustrato, en médula (Me) y corteza (Co) renal de ratas controles (C) y expandidas (E:10% pc), en condiciones basales y luego del agregado de: L-NAME 10-3 M, dopamina 10-6 M (DA), carbacol 10-6 M (CA) y haloperidol 10-6 M +CA 10-6 M (H+CA). Resultados: Actividad de NOS (pmol/mg de tejido):

Me	Basal	L-NAME	CA	DA	H+CA
C	430±35	313 ±28#	1101±83#	802±51#	1022±72#
E	880±42*	334±30#	1682±121#	1036±85#	1628±109#
Co					
C	331±32	245±22#	925±79#	690±57#	914±84#
E	604±38*	263±21#	1301±111#	962±75#	1263±102#

(*p<0.01 vs control;#p<0.01 vs basal) La actividad basal de NOS fue mayor en el grupo E que en el C, en corteza y médula. En ambos grupos la actividad de NOS disminuyó con L-NAME, fue máxima con CA y aumentó con DA. La respuesta al CA no se modificó con el bloqueo dopaminérgico. La expansión del volumen extracelular induce un aumento de la actividad de NOS en médula y corteza renales. La acción de la DA renal involucraría, entre otros mecanismos, el aumento de la producción de NO a través de la activación de NOS.

NEUROCIENCIAS II

150. Progresión témporoespacial de la astrocitosis reactiva a la infección persistente por virus Junín. Roberto L. Caccuri(1), Rubén F. Iacono(2), Mercedes C. Weissenbacher(1), María M. Avila(1), María I. Berría(1).

(1)Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina-UBA (2)IDEHU-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA
mailto:rcaccuri@fmed.uba.ar

Dado que la inoculación intracerebral de virus Junín (VJ) cepa XJ a ratas recién nacidas induce una enfermedad inicialmente aguda y luego inaparente hasta la emergencia de un síndrome neurológico crónico (Weissembacher MC, Lascano EF, Avila MM, Berría MI. J Med Virol 1986; 20: 57-65), se recurrió a ese modelo para la caracterización histométrica de una respuesta astrocitaria concomitante a una infección persistente. De las primitivas muestras de encéfalos oportunamente incluidas en parafina, se obtuvieron nuevos cortes histológicos para su procesamiento por inmunoperoxidasa. A 400 X y en sector delimitado por retícula de 0.01 mm² de sección, se contaron células inmuno-reativas en 16 áreas de corteza frontotemporal elegidas al azar. Las neuronas VJ+, evidentes al día 10 pi (16.8 ± 9.7), alcanzaron valores máximos al 30 (27.8 ± 6.9) para luego descender acentuadamente en los periodos intermedio asintomático (4.2 ± 3.5) y de enfermedad crónica aparente (0.5 ± 0.6). Con respecto a controles, en los infectados el número de astrocitos activados (GFAP+) estuvo significativamente aumentado en los periodos agudo (11.2 ± 0.7 vs 19.0 ± 0.6) y crónico (26.5 ± 0.8 vs 31.5 ± 1.3), pero no en el intermedio (19.2 ± 0.7 vs 20.3 ± 0.5). La asociación de una incrementada astrocitosis con la exteriori-

zación de una u otra fase de la enfermedad, sugiere la posibilidad de que una tardía reactivación astrocitaria pudiera actuar como factor neuropatogénico per se.

151. Esclerosis del hipocampo: Diagnóstico de lateralidad a través del análisis visual comparado con la volumetría por Resonancia Magnética. Damián Consalvo(1), Walter Silva(2), Silvia Oddo(2), Brenda Giagante(3), Patricia Solís(3), Gustavo Schuster(4), Roberto Sica(3), Silvia Kochen(3).

(1)Centro de Epilepsia, División Neurología, Hospital Ramos Mejía, CONICET, Fundación FEMIEN (2)Centro de Epilepsia, División Neurología, Hospital Ramos Mejía, CONICET (3)Centro de Epilepsia, División Neurología, Hospital Ramos Mejía (4)Fundación FEMIEN
mailto:dconsalvo@janssen.com.ar

Introducción: El análisis o medición volumétrica del hipocampo (VH) es considerado un método más sensible que el análisis visual (AV) para el diagnóstico de la esclerosis del hipocampo (EH) por medio de las imágenes por Resonancia Magnética (IRM) en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. Objetivo: Comparar los resultados del AV y de la VH para el diagnóstico de lateralidad de la EH. Material y Métodos: Se seleccionaron pacientes con una clara zona epileptógena temporal mesial definida a través del diagnóstico clínico y EEG. Todos los pacientes fueron evaluados por medio del AV y la VH de sus IRM. Una VH fue considerada anormal si el valor obtenido se ubicaba 2 desvíos estándar por debajo de una población control normal. Resultados: Se incluyeron 46 enfermos, 23 de sexo femenino, edad media 35.9 ± 9.9 años (rango 20-61), tiempo de evolución de la epilepsia 25 ± 11.5 años (rango 5-48). Veintitrés enfermos mostraron EH izquierda por AV y 20 por VH, 20 enfermos mostraron EH derecha por AV y 16 por VH, 3 pacientes mostraron EH bilateral por AV y VH y en 7 la VH fue normal. Conclusión: En nuestro trabajo, la VH mostró un rendimiento menor, aunque no significativo, en relación con el AV para establecer la lateralidad del lado afectado a través de las IRM.

152. Inhibición presináptica de la liberación espontánea de acetilcolina en sinapsis neuromuscular de mamífero: Adenosina o ATP?. Silvana De Lorenzo(1), Mariela I. Veggetti(2), Salomón Muchnik(2), Adriana S. Losavio(2).

(1)Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (2)Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari
mailto:alosalavio@mail.retina.ar

El ATP es capaz de inducir inhibición presináptica de la liberación espontánea de ACh. Hasta el presente no se sabe si este efecto se debe a una acción directa del ATP al unirse a sus receptores (R)P2 o a un efecto indirecto a través de su metabolito activo adenosina, al activar sus RA1. Nuestro propósito es investigar si la modulación inducida por ATP es ejercida a través de sus RP2, independientemente de su degradación a adenosina. En hemidiafragmas de ratones CF1 se estudió el efecto del ATP sobre la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPPs) luego que los RA1 fueran bloqueados por DPCPX, antagonista específico de RA1. DPCPX no modificó el valor de la fMEPPs y la aplicación de ATP redujo la fMEPPs al 61.2±1.2% de los valores controles (n=5). El agregado de CCPA, agonista específico de los RA1, no modificó la fMEPPs observada con DPCPX+ATP, confirmando que los RA1 estaban bloqueados (58.6±1.7%). En presencia de a,bmetilADP, bloqueante de la hidrólisis de ATP a adenosina, ATP inhibió la fMEPPs al 54.7±2.4% de los valores controles (n=5). El ATP en diafragmas previamente expuestos a Suramina, antagonista no selectivo de los RP2, no ejerció su efecto modulador; el agregado de CCPA, redujo la fMEPPs al 51.8±1.1% de los valores controles (n=4). Estos resultados sugieren que tanto adenosina como ATP tendrían un efecto similar sobre la liberación espontánea de ACh en sinapsis neuromuscular de mamífero, actuando en forma independiente a través de sus R específicos

- 153. Cambios funcionales en el sistema nervioso central en ratas hipertensas portales prehepáticas.** Camila Scorticati(1), Juan Prestifilippo(1), Gustavo Murer(2), Abraham Lemberg(1), Juan Perazzo(1).

(1)*Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA* (2)*Laboratorio de Neurofisiología. Cátedra de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA*
cscorti@ffyb.uba.ar

Introducción: La hipertensión portal prehepática experimental produce alteraciones morfológicas en la barrera hematoencefálica (BHE), astrogliosis y angiogénesis en áreas CA4 y CA1 del hipocampo en cerebro. Objetivos: Estudiar los posibles cambios funcionales de la BHE en ratas HP. Métodos: Se usaron ratas Wistar Kyoto macho de 240g las que se dividieron en :GI (n=8) hipertensas portales por estrechez reglada de la vena porta; GII (n=6) con operación simulada (sham). Se determinaron: integridad funcional de la BHE por Trypan Blue (TB, Reynolds), concentración proteica (CP) en líquido cefaloraquídeo (LCR, Bradford), actividad eléctrica cortical (EEG según Popken), contenido de agua en cerebro (gravimetría) y test conductuales: Animex, rigthing reflex, dolor y Rotarod. Resultados: El TB fue positivo en áreas perivasculares e hipocampo solo en el GI; la CP en LCR (ug/ml) fue (X±SEM); GI: 40.6±6.8 y GII: 16.5±4.2 (p<0.005) y en plasma (mg/ml): GI: 108.8±7.6 y GII: 87.4±2 (NS). El EEG se mostro alterado con predominancia de onda delta para GI:0.560±0.044 y GII:0.378±0.044 (p<0.001), El porcentaje de agua por g/telido cerebral fue: GI 79.21±0.2, GII:78.95±0.18 (NS). Conclusiones: Estos resultados demuestran la existencia de cambios funcionales en la BHE con una presentación subclínica de encefalopatía hepática en ratas con HP.

Ganador del Premio «Esteban Montuori»

- 154. Mutaciones en el gen de neurofibromatosis tipo 2 en tumores del sistema nervioso central.** Ezequiel I. Surace(1), Gloria A. Machiavelli(2), Javier H. Cotignola(3), Viviana K. Dalamón(4), Alvaro Campero(5), Armando Basso(6), Daniel Rochefort(7), Jan Dumanski(8), Guy Rouleau(9), Irene Szijan(1).

(1)*Genética y Biología Molecular, Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA* (2)*Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas* (3)*Genética y Biología Molecular, Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA* (4)*Genética y Biología Molecular, Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA* (5)*Hospital de Clínicas José de San Martín, Fac. de Medicina. UBA* (6)*Hospital de Clínicas José de San Martín, Fac. de Medicina. UBA* (7)*Neuroscience Research Institut, McGill Univ. Montreal, Canada* (8)*Rudbeck Laboratory, Uppsala University, Suecia* (9)*Neuroscience Research Institut, McGill University, Montreal, Canada*
mailto:esurace@hotmail.com

La neurofibromatosis 2 se caracteriza por el desarrollo de tumores, principalmente schwannomas y meningiomas en el SNC y periférico. La causa es la alteración en el gen supresor de tumor NF2 (22q12) la cual también puede ocurrir en tumores esporádicos. El objetivo del trabajo es evaluar el papel del gen NF2 en diferentes tumores esporádicos del SNC. Se estudiaron mutaciones de NF2 en 25 tumores (13 meningiomas, 4 schwannomas, 4 metástasis de origen no nervioso y otros) obtenidos de cirugías en el Hospital de Clínicas. El ADN tumoral se analizó por PCR-Heteroduplex (detectado por HPLC) y posterior secuenciación. Algunos tumores fueron analizados además por 'microarray' para detectar grandes rearrreglos. Luego de examinar todos los exones de NF2 se caracterizaron 7 mutaciones pequeñas (5 en meningiomas y 2 en schwannomas). Seis de ellas predicen la formación de una proteína trunca debido al corrimiento en el marco, creación de codón stop o interferencia con empalme de exones. La otra mutación predice el salto de un exón. Se detectaron grandes deleciones abarcando el gen NF2 y regiones vecinas en 2 de

8 meningiomas. Se identificaron así mutaciones en el gen NF2 en 8 de los 17 meningiomas y schwannomas estudiados y no se detectaron mutaciones en otros tumores del SNC. Por lo tanto la inactivación de la proteína NF2 es un hecho común en meningiomas y schwannomas, tanto hereditarios como esporádicos.

- 155. Incidencia de ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes en la población argentina.** Pilar P. Igarreta(1), Mariana M. Herrera(1), Rosa R. Bertolini(1), Viviana V. Bernath(1).

(1)*Genda*
mailto:genda@genda.com.ar

Las ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes (SCAs) constituyen un grupo heterogéneo de desórdenes neurodegenerativos caracterizados por disfunción del cerebelo y del tronco cerebral. Se originan en expansiones anómalas de tripletes en zonas codificantes de los genes afectados. El grado de incidencia de cada tipo de ataxia varía en las distintas poblaciones. En nuestro país, no hay datos poblacionales acerca de la incidencia de estas ataxias debido a la baja accesibilidad de estos estudios genéticos. El objetivo de este trabajo es: a) confeccionar tablas de frecuencias de alelos polimórficos normales con la población de nuestro país; b) efectuar el diagnóstico por biología molecular de SCA tipo 1, 2, 3 y 6 en pacientes seleccionados en base a sus síntomas clínicos y a sus antecedentes familiares. Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de sangre. Se hizo una primera amplificación por PCR fría de la zona del gen afectado para cada ataxia con el fin de detectar alelos expandidos, y una segunda amplificación radiactiva con el fin de determinar el tamaño de cada alelo con precisión. El número de repeticiones del triplete fue calculado en base al tamaño de los fragmentos amplificados. La incidencia en pacientes sintomáticos de cada ataxia es la siguiente: 10% para SCA1 (n=30), 16% para SCA2 (n=38), 8,3% para SCA3 (n=36) y ningún caso para SCA6 (n=30). Estamos llevando a cabo estos mismos estudios para SCA7 y SCA8.

- 156. Ansilisis o ansiogénesis producida por los neuroesteroides allopregnenolona y pregnenolona en diferentes etapas reproductivas de la rata hembra.** Myriam Laconi(1), Guillermo Casteller(1), Ricardo Cabrera(1).

(1)*LINCE-IMBECU-CONICET y Facultad de Ciencias Médicas U.N. de Cuyo*
rcabrera@lab.cricyt.edu.ar

Los neuroesteroides son moléculas sintetizadas en el sistema nervioso central. El objetivo del trabajo fue evaluar patrones de ansiedad y actividad locomotora en diferentes estadios del ciclo reproductivo de ratas hembra tras la administración de allopregnanolona (All) o pregnanolona (Pe). Los grupos experimentales fueron: OVXi impregnadas (estrógeno 25ug/rata y progesterona 1 mg/rata s.c), OVX sin impregnar y preñadas en el día 15 (n=8 animales/grupo). All (6uM), solución Krebs (KRB) y Bicuculina (Bi: 25ng/rata) fueron administradas intracerebroventricularmente. Se evaluó ansiedad (test de encrucijada elevada) y actividad locomotora (open field). Se cuantificó el tiempo de permanencia en el brazo abierto (TPBA), en el extremo abierto distal (TPEAD), número de entradas en el brazo abierto y cerrado (NEBA-NEBC). Se utilizó ANOVA I y Test-t para comparaciones estadísticas. TPBA y TPEAD fueron mayores con All (P<0.01) y con Pe (P<0.001) en OVXi respecto del control. No hubo modificaciones en OVX con ninguno de los neuroesteroides. Los patrones locomotores se mantuvieron sin cambio en estos grupos. El día 15 de preñez TPBA y TPEAD disminuyeron con All (P<0.01) y Pe (P<0.01). Bicuculina revirtió este efecto cuando se la combinó con los neuroesteroides. No se observaron modificaciones en los patrones locomotores. Concluimos que el efecto de All y Pe estarían influenciados por el estatus hormonal del animal modificando la reactividad GABAérgica a nivel central.

- 157. La Oxido Nítrico Sintasa mitocondrial de cerebro: su influencia sobre el estado redox durante el desarrollo posnatal del cerebro de rata.** Mariana Melani(1), Natalia A. Riobó(1), Francisco Schopfer(1), María C. Carreras(1), Juan J. Poderoso(1).

(1)Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.
mari_mela@hotmail.com

Previamente describimos la existencia de una Oxido Nítrico Sintasa en mitocondrias de cerebro de rata (mtNOS). Esta mtNOS tiene una mayor expresión y actividad en mitocondrias de neonatos en comparación con mitocondrias de cerebros de ratas adultas (151 vs 14 pmol H3-citruilina/min mg). Considerando que el óxido nítrico (NO) estimula la producción mitocondrial de especies activas del oxígeno, el objetivo del trabajo fue estudiar la influencia de una elevada producción de NO en el estado redox del cerebro en desarrollo. Así, determinamos por fluorometría la tasa de producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en mitocondrias de cerebros neonatos y adultos. Los primeros mostraron mayor respuesta al agregado exógeno de antimicina A (0.44 ± 0.12 vs 0.2 ± 0.07 nmol/min mg prot, $p=0.05$). Asimismo, observamos que las mitocondrias de los neonatos son capaces de producir mayores niveles de H₂O₂ en respuesta al agregado de L-arginina, sustrato de la NOS, que la mitocondrias de los adultos (0.44 ± 0.17 vs 0.08 ± 0.03 nmol/min mg prot, $p=0.001$). Esta producción es NOS dependiente ya que resulta totalmente inhibida tras el agregado de L-NMMA, inhibidor NOS específico. Asimismo, las mitocondrias de cerebro de neonatos poseen mayor actividad de la enzima superóxido dismutasa mangánica (Mn-SOD) (50%) y mayores niveles de ubiquinol (13%). Estos tres factores contribuirían a aumentar la producción de H₂O₂ mitocondrial, mensajero clave en procesos de plasticidad sináptica durante el desarrollo.

Ganador del Premio «Esteban Montuori»

INMUNOLOGÍA IV

- 158. Antigenicidad y protección de una proteína recombinante (P6) de Haemophilus influenzae (tipificables y no tipificables) administrada por vía nasal con amantadilamida dipéptido como adyuvante de mucosa.** Gustavo M. Bertot(1), Pablo D. Becker(2), Carlos A. Guzman(3), Saúl Grinstein(2).

(1)Laboratorio de Virología, Hospital de Niños «Ricardo Gutierrez» Buenos Aires, Argentina (2)Laboratorio de Virología, Hospital de Niños «Ricardo Gutierrez», Buenos Aires, Argentina (3)Grupo de Investigaciones sobre vacunas, GBF, Braunschweig, Alemania

La disponibilidad de una vacuna contra Haemophilus influenzae tipo b (Hib) ha reducido dramáticamente la incidencia de enfermedad causada por el Hib en niños; consecuentemente los Haemophilus influenzae no tipificables pasaron a ser relevantes como los principales patógenos responsables de las otitis medias en los niños asociándose además con infecciones de tejidos previamente dañados, como ocurre en pacientes con bronquitis crónicas, fibrosis quística, etc. La P6 es una lipoproteína altamente conservada presente en la membrana externa de las cepas tipificables y no-tipificables de Haemophilus influenzae (Hi). La inmunización de ratones por vía nasal con P6 recombinante (rP6) combinado con amantadilamida dipéptido (AdDP) como adyuvante de mucosas induce anticuerpos específicos de tipo IgA en suero, lavado broqueoalveolar (BAL), lavado vaginal y saliva, entretanto solo se observa una débil respuesta en extractos fecales y en lavados nasales. La rP6 induce la producción de anticuerpos específicos de tipo IgG en suero y en BAL pero no en otras mucosas. Finalmente, los ratones inmunizados por la vía nasal con rP6 y AdDP aumentan la capacidad de eliminar bacterias del epitelio pulmonar posteriormente a un desafío con bacterias vivas. En conclusión, la rP6 se presenta como un antígeno efectivo cuando es

administrado por vía nasal junto a AdDP por su capacidad para inducir una respuesta antígeno específica a nivel sistémico y protectora a nivel de las mucosas.

- 159. La estimulación de linfocitos T por microagregación de las moléculas CD3 y CD28 induce la expresión de MICA a través de ERK, p38 MAP quinasa, p70S6 quinasa y calcineurina.** Luciana L. Molinero(1), Mercedes B. Fierres(1), Gabriel A. Rabinovich(1), Leonardo Fainboim(1), Norberto W. Zwirner(1).

(1)Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Buenos Aires

MICA es una molécula del sistema HLA que funciona como sensor de estrés reconocido por células citotóxicas que expresan la molécula NKG2D. MICA puede inducirse en células T activadas con PHA o con células alogeneicas. Con el objetivo de estudiar las señales y mediadores intracelulares que inducen la expresión de MICA en linfocitos T, estudiamos el efecto de la microagregación del complejo TCR/CD3 y de la molécula CD28, así como los mediadores intracelulares involucrados. Por Western blot observamos que linfocitos T activados con AcMo anti-CD3 o anti-CD28/PMA inducen la expresión de MICA. La estimulación de linfocitos T con los AcMo mencionados en presencia de los inhibidores farmacológicos U0126 (inhibidor de MEK1), SB202190 (inhibidor de p38 MAP quinasa) o rapamicina (inhibidor de p70S6 quinasa) indujo una fuerte inhibición de la expresión de MICA. Ciclosporina A y FK506 (inhibidores de calcineurina) indujeron un marcado efecto inhibitorio pero sólo en linfocitos T activados con AcMo anti-CD3. Concluimos que la microagregación de CD3 y CD28 en células T induce la expresión de MICA involucrando la participación de MEK1/ERK, p38 MAPK y p70S6 quinasa, así como calcineurina. El reconocimiento de MICA podría inducir citotoxicidad de los linfocitos T activados, mediada por células NKG2D+, lo que podría representar un nuevo punto de control de la activación linfocitaria con el objeto de mantener la homeostasis de la respuesta inmune.

- 160. Expresión de citoquinas en Hepatitis Autoinmune tipo I.** Natalia Paladino(1), María De Biasio(1), Andrea E. Rubio(1), Mirta Ciocca(2), Miriam Cuarterolo(2), Alejandra C. Cheriavsky(1), Leonardo Fainboim(1).

(1)Hospital de Clínicas «José de San Martín». Servicio de Inmunogenética (2)Hospital de Pediatría «J.P. Garrahan». Servicio de Hepatología
mailto:accher@fbertel.com.ar

La hepatitis autoinmune pediátrica (HAIp) tipo I es una patología hepática de etiología desconocida con un marcado componente inflamatorio y frecuente progreso hacia la cirrosis, que responde ante el tratamiento inmunosupresor. Nuestro objetivo fue estudiar el perfil de citoquinas predominantes en el hígado de pacientes con HAIP. La expresión de IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12Rb2, IL-18, IFN-g, TNF-a y TGF-b fue estudiada por RT-PCR, y la presencia de IL-12p40 e IL-18 por Western blot en biopsias hepáticas de diagnóstico provenientes de 7 pacientes de 10 años de edad promedio (rango 7-14), y comparada con tejidos normales provenientes de 8 donantes cadavéricos de 12 años promedio (rango 8-20). Observamos un aumento significativo en la expresión IL-12p40, IL-12Rb2, IFN-g e IL-4 en HAIP mientras que IL-10, TNF-a y TGF-b no presentaron diferencias con respecto a los controles. El aumento también significativo para el transcripto IL-18 en HAIP (147.133 ± 50.25 vs 0.36 ± 0.15 en controles, $P=0.0043$, Mann-Whitney U test, dos colas) no se correlacionó con la presencia de péptido maduro: HAIP y controles expresan solo el precursor de IL-18 mientras que IL-12p40 solo se expresó en HAIP. El aumento de los niveles de expresión de INF-g, IL-12p40, IL-12Rb2 e IL-18 sugieren una respuesta predominante tipo I. La expresión diferencial de IL-4 en HAIP no previene la expresión de citoquinas tipo Th1 y sugiere la probable participación de citoquinas de tipo Th2 en su patogénesis.

- 161. CD85/LIR1/ILT2: nueva perspectiva para el control de la respuesta inmune a aloantígenos?** María C. Salamone(1), Gabriela V. Salamone(2), María M. Cortés(3), Gloria B. Reyes(3), Adriana Corigliano(3), Marcos Barboza(4), Leonardo Fainboim(4).

(1)Laboratorio de Inmunogenética, Htal de Clínicas. José de San Martín (2)Academia Nacional de Medicina (3)Laboratorio de Inmunogenética, Htal de Clínicas. José de San Martín (4)Laboratorio de Inmunogenética. Htal de Clínicas. José de San Martín
mays@sinectis.com.ar

La molécula CD85/LIR1/ILT2 media señales negativas capaces de inhibir la activación celular. En este trabajo evaluamos la función de este antígeno en la respuesta alógena. Anticuerpos anti-CD85 bloquearon significativamente la proliferación celular del cultivo mixto alógeno (CML) (% I (índice de inhibición) > 85%). Este efecto inhibitorio pudo ser inducido aún luego de 4 días sobre clones T activados (%I= 50%) y estuvo asociado con un incremento (25-30%) en el número de células apoptóticas. El índice de bloqueo de la proliferación celular observado sobre el CML fue superior al inducido sobre CMP activadas con PHA o anti-CD3 (%I < 75%) y fue el resultado de un efecto aditivo que esta molécula ejerce sobre ambas poblaciones celulares involucradas en la respuesta alógena. También investigamos la regulación y los niveles intracelulares de CD85 en LT activados. Estudios de triple inmunomarcación citoplasmática directa revelaron que la expresión del antígeno CD85 disminuye entre los días 3 y 4 post-activación, siendo reexpresado posteriormente sobre los blastos T. La cinética desplegada por CD85 mostró solo una parcial superposición con la observada para los antígenos CD152 y CD25. Nuestros resultados sugieren: a) un rol central de la molécula CD85 en el control del CML; b) que ambas moléculas regulatorias, CD85 y CD152, podrían estar involucradas en el control diferencial de la homeostasis en las etapas de diferenciación de las células T efectoras.

- 162. Expresión y regulación de SLAM (Molécula linfocitaria activadora de señales) en la infección humana intracelular.** María F. Quiroga(1), Virginia Pasquini(2), Leonardo Fainboim(1), Verónica E. García(2).

(1)Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, UBA (2)Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA
flor_@qhotmail.com

La molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM) promueve la proliferación celular T y la producción de IFN γ . La lepra es una enfermedad infecciosa dinámica donde diferentes subpoblaciones T reactivas a *Mycobacterium leprae* controlan el espectro clínico e inmunológico. Utilizando la lepra como modelo, demostramos correlación de expresión de SLAM con expresión de IFN γ e inmunidad celular contra el patógeno. *M. leprae* indujo aumento de SLAM en pacientes tuberculoideos respondedores, y virtualmente todas las células SLAM+ produjeron IFN γ , sugiriendo que el IFN γ participaría en la regulación de SLAM. *M. leprae* no indujo modificación de la expresión de SLAM en pacientes lepromatosos no respondedores pero esto no se debió a una falla general para expresar SLAM, ya que la estimulación de células de estos individuos con *M. tuberculosis* aumentó significativamente la expresión de SLAM. Asimismo, la señalización a través de SLAM en células T activadas por antígeno indujo un significativo aumento de IFN γ en pacientes tuberculoideos pero sólo un leve incremento de los niveles de la citoquina en pacientes lepromatosos. Sin embargo, el tratamiento con IFN γ exógeno aumentó la expresión de SLAM en pacientes lepromatosos y la posterior señalización a través de esta proteína incrementó el IFN γ en estos individuos hasta niveles comparables a los de pacientes tuberculoideos. Estos resultados sugieren que SLAM promueve la inmunidad mediada por células contra patógenos intracelulares.

- 163. Envejecimiento: participación de neutrófilos en la captación y transporte de antígeno en animales inmunes.** Andrea S. Rópolo(1), Belkys A. Maletto(1), Diego O. Alignani(1), María C. Pistoressi(1).

(1)Depto. Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC
mailto:aropolo@bioclin.fcq.unc.edu.ar

En estudios previos observamos que dependiendo del adyuvante utilizado para inmunizar, las células responsables de tomar el antígeno en periferia y transportarlo al ganglio linfático variaban. En este trabajo profundizamos estos estudios especialmente en animales envejecidos. Para ello, animales jóvenes y envejecidos inmunizados con Ovoalbúmina emulsionada en Adyuvante de Freund Completo (OVA-CFA) fueron inyectados en la planta de la pata con OVA marcada con isotiocianato de fluoresceína (OVA-FITC). Seis horas después se encontró en ganglio poplíteo una población de células OVA-FITC+ que además eran CD11b+/GR-1+/MHC clase II- (neutrófilos). El porcentaje de estas células fue menor en los animales envejecidos (5 ± 1)% que en los animales jóvenes (35 ± 2)%. La captación de OVA-FITC por parte de los neutrófilos es dependiente de anticuerpos debido a que en animales inmunes a PBS-CFA el porcentaje de células OVA-FITC+ no presentó diferencias con el control (inmunes a OVA-CFA e inyectados con OVA-FITC). En la piel, los neutrófilos de animales envejecidos captaron menos antígeno, a pesar de que los títulos y la avididad de los anticuerpos específicos para OVA, el número de neutrófilos y la expresión de receptores para la región Fc de las Igs no presentó diferencias con los animales jóvenes. Se concluye que en presencia de anticuerpos específicos los neutrófilos captan antígeno en piel y lo transportan a órganos linfáticos, y que este mecanismo está alterado en el envejecimiento.

COMUNICACIONES EN POSTERS

ENDOCRINOLOGÍA IV

- 164. Efecto no genómico de Progesterona en tejido vascular: activación de ciclooxigenasa (COX) y óxido nítrico sintasa (NOS).** Juana Sellés(1), Alicia Santi(1), Néliida Polini(1), Virginia Massheimer(1).

(1)Cátedra de Análisis Clínicos, Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur
mailto:massheim@uns.edu.ar

La prostaciclina (PGI $_2$) producida por la ciclooxigenasa (COX) y el óxido nítrico (NO) generado por la óxido nítrico sintasa (NOS) son potentes agentes vasodilatadores y anti-trombóticos. Estudiamos el mecanismo de acción no genómico de progesterona (Pg) sobre el metabolismo endotelial en tejido aórtico de rata. Utilizando 3H-araquidonato y 3H-arginina como precursores se obtuvieron evidencias que Pg (1-100 nM) incrementa la producción de PGI $_2$ (42-182%, $P < 0.001$) y de NO (40 - 89%; $P < 0.025$). El perfil temporal de la respuesta es bifásico con un aumento máximo a los 5 min. La regulación de NOS es dependiente del influjo de calcio ya que la preincubación con 10 μ M Verapamil (antagonista de canales de calcio) atenúa marcadamente el incremento de NO. Utilizando RU486 (antagonista del receptor de Pg) se evaluó la participación del receptor de Pg. El incremento en NO inducido por 10 nM Pg (1.11 vs 0.61 pmol/mg prot tratado vs control) no fue alterado por la presencia de 10-7-10-5 M RU486. Resultados semejantes se obtuvieron al cuantificar la producción de PGI $_2$ en presencia de RU486. Se estudió si el aumento en PGI $_2$ inducido por Pg es dependiente de NO. El inhibidor específico de NOS, L-NAME (10-5 M) suprimió totalmente el aumento en PGI $_2$. Estos resultados sugieren que Pg estimula la producción de NO y consecuentemente induce la activación de COX a través de un mecanismo independiente del receptor citosólico nuclear, y que involucra el influjo de calcio del medio extracelular.

165. La respuesta médula adrenal y los índices de ansiedad son afectados por privación materna temprana en ratas y el núcleo anterodorsal talámico participa en la regulación de estas respuestas. María A. Rivarola(1), Sandra M. Molina(1), Marta M. Suárez(2), Gloria Levin(3).

(1)Instituto de Fisiología. Facultad de Ciencias Médicas. UNC (2)Cátedra de Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. UNC (3)CEDIE, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Endocrinología. Buenos Aires mailto: smolina@mater.fcm.unc.edu.ar

La separación materna afecta la respuesta neuroendócrina y comportamental en la vida adulta y esto puede ser un factor de riesgo en la génesis de trastornos de ansiedad. Por otro lado, en trabajos previos demostramos que el Núcleo Anterodorsal Talámico (NADT) ejerce una influencia inhibitoria sobre la actividad de eje Hipofiso-Adrenal (HA). El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la privación materna sobre los índices de ansiedad en ratas adultas, analizar la respuesta médula-adrenal al test de ansiedad y determinar el papel del NADT sobre estas respuestas. La privación materna se realizó separando las crías 4,5 hs diarias durante las tres primeras semanas de vida. El índice de ansiedad se evaluó en un laberinto en cruz elevado. Para determinar la respuesta simpático-adrenal se valoraron los niveles de catecolaminas plasmáticas Noradrenalina (NA) y Adrenalina (A) por HPLC. Los resultados indicaron que: La privación materna provocó una disminución de la ansiedad, evidenciada por un aumento en el porcentaje de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos ($p < 0.05$), y la lesión del núcleo acentuó este efecto ($p < 0.05$). Los valores de NA y A, luego del test aumentó de manera marcada en los animales privados y lesionados ($p < 0.05$), confirmando la acción inhibitoria del NADT. Como conclusión la privación materna afecta a largo término los índices de ansiedad, los patrones de actividad médula adrenal y la regulación ejercida por el NADT.

166. Metabolismo de la 5-hidroxi-6-iodo-eicosatrienoico delta lactona (125I-IL) en células tiroideas bovinas. Lisa Thomasz(1), Mabel Viaggi(1), Pablo Nosedá(1), Alejandra Dagrosa(1), Marcos Agote(1), León Krawiec(1), Laura Bocanera(1), Mario Pisarev(1), Guillermo Juvenal(1).

(1)Comisión Nacional de Energía Atómica mailto: lisa75ar@yahoo.com.ar

El yodo es utilizado por la tiroides para sintetizar hormonas tiroideas y lípidos iodados, uno de ellos la IL (derivado del ácido araquidónico). Los resultados obtenidos han permitido demostrar que este compuesto reproduce los efectos inhibitorios del yodo sobre una serie de parámetros, tales como inhibición del crecimiento tiroideo, producción de H_2O_2 , etc. A fin de comenzar a estudiar el metabolismo de la IL se la ha marcado con ^{125}I . Foliculos de tiroides bovinas en suspensión fueron incubados con ^{125}I o ^{125}I -IL durante 1 y 24 hs en presencia o ausencia de $KClO_4$ (competidor del yoduro) o MMI (bloqueante de la peroxidasa tiroidea). El $KClO_4$ bloqueó la captación del ^{125}I (66%), mientras que el MMI bloqueó su organificación (91%) y la captación (a las 24 hs) (95%). Cuando se estudió la captación de la ^{125}I -IL no hubo efecto alguno del $KClO_4$ ni del MMI. Cuando se midió si la ^{125}I -IL se incorporaba a proteínas, observamos que la misma estaba incorporada en más de un 90%. Dicha incorporación no se afectó por el MMI. Los precipitados de los foliculos incubados con el iodolípido fueron sometidos a una electroforesis en gel y se hizo posteriormente una radioautografía. Se pudo observar una banda correspondiente a un PM de aproximadamente 9500. Cuando se incubó previamente los foliculos con proteasas desaparece dicha banda. Conclusión: la ^{125}I -IL es captada por la célula tiroidea e incorporada a una proteína posiblemente una acil carrier binding protein.

167. Efecto de la restricción energética leve y crónica sobre el contenido y liberación de LHRH hipotalámica en la rata en crecimiento. Cecilia Compagnucci(1), Gabriela

Compagnucci(1), Alejandro Lomniczi(1), Claudia Mohn(2), Elisa Cebal(2), Juan Elverdin(1), Valeria Rettori(2), Patricia Boyer(1).

(1)Cátedra de Fisiología, FOUBA (2)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET).

En estudios previos observamos retraso puberal, disminución de los niveles séricos de LH y de Testosterona (T) en animales con enanismo por desnutrición (ED). Nuestro objetivo fue analizar las posibles modificaciones en el contenido hipotalámico y/o en la secreción de LHRH 'in vitro' así como la morfología espermatogénica en esta disfunción. Ratas macho Wistar al destete (T0) se dividieron en 2 grupos ($n=10-12$): Control (C) y ED. C recibió una dieta equilibrada para roedores ad libitum. ED un 80% de la consumida por C el día previo, durante 4 semanas (T4). Luego fueron alimentados ad libitum por 8 semanas (T12). Determinaciones: 1) Peso (P) y Longitud (L) corporales. 2) En hipotálamo medio basal: contenido y liberación 'in vitro' de LHRH durante 3hs (RIA). 3) En suero: LH (RIA) y testosterona (T) (RIA). 4) Morfología espermática en epidídimo caudal. Resultados ($x \pm ES$): 1) P y L de ED vs C disminuyeron significativamente a T4 ($p < 0.001$). 2) Contenido y liberación 'in vitro' de LHRH C vs ED no fue significativo en los tiempos estudiados. 3) LH (pg/ml) de ED vs C fue de $0,11 \pm 0,02$ vs $0,31 \pm 0,07$ a T4 ($p < 0,001$); T (ng/ml) de ED vs C fue $< 0,1$ vs $0,32 \pm 0,04$ a T4 ($p < 0,001$). 4) A T4 la frecuencia de anomalías espermáticas aumentó aprox. 15% ($C=22,04 \pm 2,09$ vs $ED=36,92 \pm 2,34$) ($p < 0,001$) con anomalías en cabeza exclusivamente. Todos los parámetros se normalizaron durante la realimentación. Estos resultados sugieren una sensibilidad diferencial adenohipofisaria y/o testicular en el ED.

168. Polimorfismo de FSH en ausencia de gonada masculina: efecto de la testosterona. Veronica Ambao(1), Fernanda M. Ferraro(1), Silvina F. Creus(1), Silvia Gottlieb(1), Stella Campo(1).

(1)Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina. mailto: fenana@hotmail.com

La Hormona Foliculo Estimulante (FSH) es secretada en múltiples formas moleculares las cuales poseen diferentes características biológicas. Esta heterogeneidad molecular está regulada por el entorno hormonal. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la administración de testosterona sobre el polimorfismo de la FSH circulante en pacientes anórquidos. Se estudiaron cinco pacientes puberales (edad: 13.5-19.2 años) antes y después de la administración i.m. de enantato de testosterona (ET); se los comparó con 9 varones normales (edad: 13.5 - 18 años). La distribución de análogos de carga se determinó por isoelectroenfoque preparativo. La distribución de isoformas de acuerdo a la estructura interna de los oligosacáridos, por cromatografía en Concanavalina A (Con A). En controles, la FSH se aisló en un rango de pH: 3.0-4.5; en los pacientes, en condiciones basales, pH: 2.5-5.5 y post ET, pH: 2.5-5.5. En condiciones fisiológicas predominaron las isoformas de FSH con cadenas carbohidratadas altamente ramificadas: 43%; en los pacientes, las que poseen cadenas biantenarias y truncadas 55%. La administración de ET aumentó significativamente la proporción de isoformas de FSH altamente ramificadas: $23.3 \pm 11.6\%$ vs $41.6 \pm 5.1\%$, $p < 0.05$. Si bien la testosterona no modificó el contenido de ácido siálico de la FSH en los pacientes, modificó el grado de procesamiento de los oligosacáridos de FSH favoreciendo la síntesis de las isoformas predominantes en condiciones fisiológicas.

169. Péptidos natriuréticos (ANF y Nt-proBNP) en la hipertensión catecolamino-dependiente. Ana M. Puyó(1), Gloria Levin(2), Susana Cavallero(1), Belisario E. Fernández(1), Marta B. Barontini(2).

(1)Cátedra de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (2)Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET, Hospital de Niños «R. Gutiérrez» mailto: apuyo@ffybu.uba.ar

El ANF y el BNP son péptidos cardíacos con función diurética, natriurética y vasodilatadora que contribuyen a mantener la homeostasis hidrosalina. Una de las formas circulantes del BNP es la porción N terminal de su prohormona (Nt-proBNP). Los neuroblastomas (Nb) y los feocromocitomas (Feo) son tumores productores de catecolaminas (CA), los Feo presentan habitualmente hipertensión (Feo Ht) y los Nb raramente la poseen. Para dilucidar la relación de estos péptidos con las CA y la presión arterial, se estudiaron 11 Nb normotensos (2-19 a), 15 Feo (7 normotensos (Feo Nt), 6-60 a) y 11 controles (C, 6-20 a), determinándose en plasma ANF por RIA, Nt-proBNP por ELISA y CA plasmáticas y urinarias por HPLC-DE. La noradrenalina y dopamina plasmática y urinaria fueron mayores en Nb y Feo que en C ($p < 0.05$). El ANF fue elevado en Nb y Feo ($X \pm SEM$) (76 ± 13 y 93 ± 9 vs 33 ± 5 pg/ml, $p < 0.01$). En los Feo Nt el BNP fue mayor (642 ± 126 , fmol/ml) que en Feo Ht (422 ± 72), Nb (469 ± 29 , $p < 0.05$), y C (318 ± 41 , $p < 0.01$). En Nb fue mayor ($p < 0.05$) que en C. En conclusión, el hecho que el ANF esté incrementado en todos los grupos independientemente de la presión arterial, sugiere un origen tumoral del péptido. Contrariamente, el hallazgo que los pacientes con Feo Nt y los Nb mostraron niveles aumentados del BNP, sugiere que éste péptido podría ser parte de un sistema compensatorio de la acción vasoconstrictora de NA contribuyendo a mantener los niveles normales de presión arterial.

170. Estrategia para el diagnóstico de GH bioactiva en niños con baja talla. Roxana M. Marino(1), Eduardo A. Chaler(1), Mónica Warman(1), Marta Ciaccio(1), Esperanza B. Berensztejn(1), Marco A. Rivarola(1), Alicia Belgorosky(1).

(1)Laboratorio de Investigación Htal. de Pediatría J.P.Garrahan
mailto:marinorox@yahoo.com

La frecuencia de baja talla (BT) debido a GH bioactiva es desconocida debido a la dificultad diagnóstica. Solo han sido descritos dos casos en los que se hallaron dos mutaciones puntuales (MP) en forma heterocigota en el gen GH1 (D112G y R77C). El objetivo de este trabajo fue elaborar una estrategia para seleccionar posibles candidatos con este diagnóstico. Se evaluó la respuesta máxima (Rpmax) de todas las formas moleculares de GH sérica (IRMA Serono 66217) luego de dos test farmacológicos. En presencia de Rpmax normal (310 ng/ml) se analizó la bioactividad para GH por el método Nb2. Se halló en dos niños prepúberes con BT la presencia de GH inmunoreactiva normal y baja bioactividad. Se realizó el estudio molecular del gen GH1 en los pacientes (P) y padres. Se analizó el gen completo por secuenciación directa con primers específicos teniendo en cuenta la alta homología del gen GH1 con los otros cuatro genes del cluster. En P1 no se halló ninguna alteración molecular. La bioactividad de la GH podría deberse a una alteración a nivel postraduccional. En el alelo paterno de P2 se halló un cambio GporA en el exon 5 que genera la MP R183H. Este aminoácido se encuentra en la cuarta a hélice en el sitio 1 de unión de la GH con su receptor por lo que la MP podría alterar la unión al receptor. En el mismo alelo también se halló un cambio AporG en la posición +52 y AporT en la +56 del intrón 1. Estas mutaciones intrónicas podrían ser una variante polimórfica o generar un splicing anómalo.

171. Estrategia molecular aplicada al gen CYP21B para explicar variaciones fenotípicas de la mutación P30L. Roxana M. Marino(1), María E. Escobar(2), Mirta Gryngarten(2), Ignacio Bergadá(2), Andrea Arcari(2), Andrea Dardis(1), Marco A. Rivarola(1), Alicia Belgorosky(1).

(1)Laboratorio de Investigación Htal. de Pediatría J.P.Garrahan (2)División Endocrinología Htal. de niños Ricardo Gutierrez
mailto:marinorox@yahoo.com

En nuestro estudio molecular de 37 pacientes con forma clásica (fc) no clásica (NC) encontramos 3/74 cromosomas con mut. puntual (MP) P30L (4%) por ASO. Ante la presencia de dicha MP

es necesario determinar si se encuentra aislada o asociada a una del/conv. del extremo 5' del gen. Las del/conv. descritas en Cyp21B comprenden una región de 30 Kb que abarca parte del Cyp21A, el C4B y parte del Cyp21B formando un híbrido A/B. El punto de unión entre ambos es variable. La mayoría ocurre entre E6 y E8 y menos frecuente entre E3 y E4 pudiendo estar más hacia el extremo 5'. A los 3 alelos que presentaron la MP P30L se les realizó Southern blot con TaqI y BglII para estudiar la delección. Dos pacientes presentaron la MP y la forma NC, en el otro se halló la delección asociada a I172N. Dicha paciente presentó al nacer fenotipo femenino sin signos de virilización. A los 2,58 años se observó hipertrofia de clítoris con edad ósea de 6 años y niveles séricos elevados de 17OHP y andrógenos adrenales confirmaron el diagnóstico de hiperplasia suprarrenal congénita. Mediante estudios posteriores: detección de la MP Ex3 e In2, PCR y secuenciación se pudo concluir que el punto de unión del híbrido se hallaba entre el Ex1 y comienzos del In2. Esta fc intermedia entre virilizante simple y NC puede explicarse ya que el alelo que porta el híbrido contiene dos mut. deletéreas P30L y el promotor del pseudogen, generando una alteración más severa que las MP típicas para fc NC y menos que para fc clásicas.

172. Regulación de la 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (HSD2) por glucocorticoides en respuesta al estrés. Marisa L. Zallochi(1), Laura B. Matkovic(1), Carlos P. Lantos(1), María C. Damasco(2).

(1)Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires (2)Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
mailto:mzallo@qb.fcen.uba.ar

El estrés agudo produce un aumento de la actividad de la enzima 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (HSD2) microsomal renal en animales intactos. Estudiamos el papel de la glándula adrenal sobre la activación de la enzima, para ello realizamos dos estudios: El primero incubando con corticosterona (B) tritiada y NAD+, microsomas provenientes de animales adrenalectomizados (ADX) y ADX inyectados con 3, 12 y 220 μ g de B. El segundo incubando microsomas provenientes de animales ADX y ADX sometidos a estrés por gavage con HCl 200 mM (HCl), HCl inyectados con B (HCl+B) o gavage simulado (Sonda). Los niveles plasmáticos de B fueron medidos por radioinmunoensayo. Resultados: Primer estudio: ADX 100+8%; ADX+3, 12 o 220 μ g de B 82+2%; 109+9% y 153+5%, respectivamente. El aumento de corticosterona circulante produce un incremento de la actividad de la HSD2 dosis-dependiente. Segundo estudio: ADX 100+4%; Sonda 190+5%; HCl 86+10%; HCl+B 220+4%. El aumento de la actividad producido por el estrés por sobrecarga con HCl, pero no por el estrés por Sonda requiere la presencia de glucocorticoides circulantes. Conclusión: Dependiendo del agente estresante, la actividad de la HSD2 está mediada por la glándula adrenal o por factores extraadrenales.

173. Regulación de la actividad y abundancia de la isoforma NHE3 del intercambiador Na+/H+ por corticosterona y 18-hidroxicorticosterona. Marisa L. Zallochi(1), María del Pilar Igarreta(1), Carlos P. Lantos(1), Juan C. Calvo(2), María C. Damasco(3).

(1)Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires (2)Instituto de Biología y Medicina Experimental (3)Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
mailto:mzallo@qb.fcen.uba.ar

La isoforma NHE3 del intercambiador Na+/H+ de túbulo proximal renal está regulada por corticoides adrenales y es la principal responsable de la reabsorción de bicarbonato. Estudiamos el efecto de la administración de dosis crecientes de corticosterona (B) y 18-hidroxicorticosterona (18OHB) en animales adrenalectomizados sobre la actividad por fluorimetría con naranja de acridina y la abundancia de NHE3 por Western-blot en vesículas de ribete en cepillo. Actividad: Vmax (UF/min/mg prot.):

ADX 30800+1424. Operación simulada 41700+654. ADX+B: 64660+4227 con 220µg; 49765+1515 con 12µg; 43450+553 con 6µg y 39424+5125 con 1,5µg. ADX+18OHB: 66990+4988 con 12µg y 51065+4155 con 6µg y 37666+1698 con 1,5µg. Abundancia (unidades densitométricas): Tomamos ADX como 100+4%. Operación simulada 191+13%. ADX+B: 190+9% con 220µg; 178+4% con 12µg; 263+31% con 6µg y 66+2% con 1,5µg. ADX+18OHB: 165+12% con 12µg y 152+17% con 6µg; 175+13% con 1,5µg; 162+16% con 0,5µg y 132+4% con 0,1µg. El reemplazo con dosis hasta 6µg de 18OHB o de B, produce un aumento significativo del intercambio Na⁺/H⁺ y de la abundancia NHE3. Contrariamente 18OHB mantiene incrementada la abundancia con la dosis de 0,5µg sin modificar la actividad, sugiriendo la existencia de distintos mecanismos de acción.

174. El Factor de Necrosis Tumoral- alfa (TNF) induce apoptosis de lactotrofos. Marianela Candolfi(1), Verónica Zaldivar(1), Daniel Piser(1), Adriana Seilicovich(1).

(1)Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA
mailto:adyseili@fmed.uba.ar

Previamente hemos demostrado que el TNF reduce la proliferación celular adenohipofisaria y la liberación de prolactina de manera variable en el ciclo estral y dependiente de los estrógenos. Hemos examinado la apoptosis (determinada por TUNEL o morfología nuclear con tinción de yoduro de propidio) de células adenohipofisarias cultivadas en presencia de TNF (50 ng/ml) de ratas sacrificadas en estadios al azar (RS) o seleccionados del ciclo estral u ovariectomizadas (OVX). El TNF produjo un aumento del porcentaje de lactotrofos, somatotrofos y células foliculo-estrelladas (identificadas por inmunocitoquímica) con morfología nuclear apoptótica pero no de corticotrofos o gonadotrofos en ratas RS. El TNF aumentó el porcentaje de células TUNEL positivas en los cultivos de células de ratas en proestro (C 4.9 ± 0.8%; TNF 11.0 ± 2.3, p < 0.05, test t) pero no en estro (C 4.5 ± 0.8; TNF 8.0 ± 1.9) o diestro (C 2.4 ± 0.9; TNF 4.2 ± 1.7). El TNF también aumentó el porcentaje de lactotrofos apoptóticos en cultivos de células de ratas en proestro (C 7.3 ± 1.9; TNF 25.5 ± 9.4, p < 0.05) pero no en estro o diestro. El TNF no modificó el porcentaje de lactotrofos con morfología nuclear apoptótica en cultivos celulares de ratas OVX, pero lo aumentó cuando fueron incubados en presencia de E2 10-9M (p < 0.005; Chi2). Nuestros resultados sugieren que el TNF induce apoptosis de lactotrofos especialmente en el proestro, y que dicho proceso sería dependiente de los estrógenos.

175. Actividad de ornitina decarboxilasa, diamino oxidasa y poliamino oxidasa en epidídimo de Golden hamster. María P. Cassani(1), Silvia I. González-Calvar(2), Ricardo S. Calandra(3).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Instituto de Biología y Medicina Experimental, Fac. Medicina, UBA (3)Instituto de Biología y Medicina Experimental, Fac. Cs. Exactas, UNLP
scalvar@dna.uba.ar

El epidídimo participa en la maduración de los espermatozoides y presenta segmentación estructural y funcional. En este trabajo se determinó la actividad de ornitina decarboxilasa (ODC), enzima involucrada en procesos de diferenciación y duplicación celular, en cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) epididimarias. Además, se midieron las enzimas que participan en el metabolismo de las poliaminas: poliamino oxidasa (PAO) y diamino oxidasa (DAO). La act. ODC, evaluada por la liberación de 14CO₂ a partir de 14C-ornitina, mostró, en hamsteres adultos, una mayor actividad en Cu (Ca:591±13; Cu:1023±130; Co:574±64 pmoles/h/mg prot, p < 0.05). En cambio, en animales inmaduros no se observó diferencia significativa entre los diferentes segmentos. La act. DAO (umoles/h/mg prot), evaluada por la producción de D1-pirrolina a partir de 14C-putrecina en animales adultos, mostró valores muy bajos en epidídimo (rango: No detectable-13±2) com-

parada con tejido control (intestino: 366±53). La act. PAO (nmoles de H₂O₂/h/mg prot), determinada por la producción de H₂O₂ a partir de N1-acetil espermina en hamsteres adultos, resultó ser 0,72±0,09 comparada con tejido control (hígado:0,52±0,06). El perfil de ODC observado, la baja act. DAO y una moderada act. PAO reflejan una relación con la presencia de espermatozoides epididimarios y sugiere que las poliaminas podrían participar en el proceso madurativo de estas células.

176. La histamina regula la esteroidogénesis en células de Leydig a través de receptores específicos. Carolina Mondillo(1), Zoraida J. Patrignani(1), Cecilia G. Reche(1), Sol Kruse(1), Graciela Cricco(2), Elena Rivera(2), Omar P. Pignataro(1).

(1)Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales (IBYME-CONICET) (2)Laboratorio de Radioisótopos-FFyB-UBA
mailto:pignatar@dna.uba.ar

Resultados preliminares de nuestro laboratorio habían mostrado que la histamina (HA) puede ejercer algún efecto sobre las células de Leydig MA-10. En este trabajo se estudió el efecto de la HA sobre la producción de testosterona (T) en células de Leydig de rata y se caracterizaron los receptores de HA en ambos tipos celulares. Materiales y Métodos: Los ensayos de unión se realizaron con ligandos radiactivos específicos para los subtipos de receptores H1 y H2 (3H-Pirilamina y 3H-Tiotidina, respectivamente). Los valores de K_d (constante de disociación) y B₀ (número de sitios) fueron calculados a partir de gráficos de Scatchard. La determinación de T liberada al medio se llevó a cabo por RIA. Resultados: Células MA-10: Se demostró la presencia de un único sitio de unión, saturable y específico para receptores del subtipo H1 (K_d= 44 ± 16 nM; Q= 21 ± 4 fm/mg prot) y H2 (K_d= 22 ± 5 nM; Q= 0,4 ± 0,05 fm/mg prot). Células de Leydig de rata: También se identificaron receptores H1 (K_d= 42 ± 18 nM; Q= 28 ± 14 fm/mg prot.) y H2 (K_d= 20 ± 9 nM; Q= 4,5 ± 0,93 fm/mg prot). Por otra parte, se observó un efecto estimulador de HA 10-9 M sobre la síntesis de T, tanto sobre los niveles basales como sobre la estimulación provocada por dosis submáximas de hCG. Conclusión: La HA es capaz de estimular la esteroidogénesis tanto en la línea celular MA-10 (resultados previos) como en células de Leydig de rata, actuando a través de receptores específicos (Subsidios: CONICET y ANPCYT)

GENÉTICA II

177. Análisis de longitud telomérica en linfomas no-Hodgkin. Alejandra S.H. Cottliar(1), Irma R. Slavutsky(1).

(1)Departamento de Genética, Academia Nacional de Medicina
mailto:irmaslav@drwebsa.com.ar

El estudio molecular de los fragmentos de restricción terminal (TRFs) en diferentes neoplasias ha permitido detectar variaciones de longitud con predominio de acortamiento telomérico, siendo muy escasos los datos reportados en neoplasias linfoides. El objetivo del presente trabajo es efectuar el análisis de TRFs en pacientes con linfomas no-Hodgkin (LNH) y establecer su correlación con el grado de maduración celular y el nivel de proliferación. Se estudiaron linfomas foliculares (LF) (6), B difusos a células grandes (LBDCG) (4) y controles de acortamiento telomérico (C) normales (CN), línea celular K-562 (C positivo) y sangre de cordón umbilical (C negativo). El DNA extraído de pacientes y controles fue digerido con Hinfl, efectuándose técnica de Southern blot. Se hibridó con sonda telomérica (TTAGGG)₇ marcada radiactivamente. Se evaluó por densitometría la intensidad de bandas de las autorradiografías, determinándose los TRFs como picos de máxima intensidad. El acortamiento telomérico mostró diferencias significativas en los pacientes: LBDCG: 8.9±0.6Kb y LF: 3.8±0.3Kb respecto de los CN: 12.1±0.7Kb, así como también entre ambos tipos de LNH (p < 0.001). Los TRFs medios en K-562

y C negativo fueron de 5.1 ± 0.4 y 14.5 ± 2.6 Kb, respectivamente. El acortamiento telomérico observado en los pacientes con LNH, particularmente en LF, estaría asociado con el índice de proliferación y el grado de diferenciación celular. Esto sugeriría a los TRFs como un marcador tumoral en LNH.

- 178. Microsatélites como herramienta molecular para el diagnóstico directo de portadoras de Distrofia Muscular de Duchenne/Becker.** Verónica Ferreiro(1), Viviana K. Dalamón(1), Ezequiel I. Surace(1), Javier H. Cotignola(1), Gloria A. Machiavelli(2), Irene Szijan(1), Florencia Giliberto(1).

(1)Genética y Biología Molecular, Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA (2)Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas
mailto:fgilibert@ffyb.uba.ar

La Distrofia Muscular de Duchenne es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes (1:3500), recesiva y de evolución fatal. Las alteraciones moleculares en el gen de la distrofina (Xp21) son las responsables de dicha patología. Al estar ligada al cromosoma X, los hombres la padecen y las mujeres la portan. Excepcionalmente algunas portadoras presentan sintomatología. La detección de grandes deleciones (60%) en varones, es fácilmente realizada utilizando PCR multiplex. Sin embargo, en las mujeres portadoras tal estudio se ve dificultado debido a la presencia de los dos cromosomas X. Con el fin de localizar la alteración molecular en el gen de la distrofina de dos portadoras sintomáticas, se analizaron marcadores polimórficos intragénicos (STR'S). Para ello se estudió la segregación alélica intrafamiliar de 9 STR's (STR'S: Dys II, 7A, 24-28, 44v, 44A, 44B, 45, 49 y 50) por PCR radiactiva. Resultando una de las afectadas hemocigota para el locus STR 7A, confirmandose la deleción encontrada mediante posterior secuenciación de dicho locus. La otra afectada resultó hemocigota para los loci STR'S 49 y 50. Se determinó el estado de mutación de novo en las afectadas y el origen parental del alelo mutado. Se quiere demostrar la importancia del análisis de STR's como herramienta para el diagnóstico directo en mujeres portadoras de DMD.

- 179. Deleción de 4977pb en el ADN mitocondrial de músculo estriado humano.** Eliana Y. Polisecki(1), Miguel E. Marino(1), Andrea Sala(1), Gustavo A. Penacino(1), Daniel Corach(1).

(1)Servicio de Huellas Digitales Genéticas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. (shdg@ffyb.uba.ar)
mailto:elopoli@hotmail.com

El ADN mitocondrial es más susceptible al daño que el ADN nuclear. Si bien no existe un blanco específico en el ADN mitocondrial, la deleción de 4977pb, ubicada entre 8482pb y 13460pb flanqueada por una repetición de 13pb es la más frecuente. Se ha comprobado una distribución diferencial de esta deleción en los distintos tejidos, siendo el músculo estriado uno de los que presenta con mayor frecuencia esta mutación, asociado a un alto requerimiento energético y procesos oxidativos. Con el fin de evaluar la presencia de esta deleción en muestras de músculo estriado provenientes de autopsias (n=20) seleccionadas al azar, se amplificó por PCR multiplex esta deleción y una zona control en el D-Loop. Se corrieron en gel de poliacrilamida con posterior secuenciación en un Secuenciador automático ABI PRISM 310, Genetic Analyser. En 11 de las muestras se obtuvo un fragmento de amplificación de 389pb cuando se usaron los primers L8285-H13650. La secuenciación de estos fragmentos confirmó la presencia de la deleción de 4977pb comprendida entre las posiciones 8482 y 13460 respecto de la secuencia de referencia (Cambridge 1981). La cuantificación de la deleción podría constituir un biomarcador de daño de ADN mitocondrial, el cual se asocia, entre otros factores, con el aumento en la edad y el estrés oxidativo.

- 180. Estudio de diferentes transcritos de p16 en tumores hipofisarios humanos.** Gloria A. Machiavelli(1), Javier H.

Cotignola(2), Alvaro Campero(3), Oscar D. Bruno(4), José A. Burdman(5), Armando Basso(3), Florencia Giliberto(6), Verónica Ferreiro(6), Viviana K. Dalamón(6), Ezequiel I. Surace(6), Irene Szijan(6).

(1)CONICET (2)Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA. División Endocrinología, Hospital de Clínicas, UBA (3)Cátedra de Neurocirugía, Hospital de Clínicas, UBA (4)División Endocrinología, Hospital de Clínicas, UBA (5)Servicio Endocrinología, Htal. Israelita, Fundación CIMAE, Bs As, Argentina (6)Cátedra de Genética y Biología Molecular, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA
mailto:gmachi@ffyb.uba.ar

pRb y p16 son reguladores del ciclo celular y actúan como supresores de tumor. En tumores hipofisarios humanos, no se observaron mutaciones en el gen RB1 y se encontró una relación inversa entre pRb y p16. Por esta razón, se decidió estudiar la expresión de p16 en tumores hipofisarios humanos. Se estudiaron 14 tumores por RT-PCR y se observaron bandas de expresión en 11/14. Los 3 restantes no expresaron p16. Los 14 expresaron GAPDH. En 4/11 se vio mayoritariamente la banda correspondiente a p16; en los otros se vieron además bandas de menor tamaño. Se comprobó la especificidad de las bandas al hibridar con una sonda específica para p16. Para estudiar las distintas bandas, las mismas fueron clonadas y secuenciadas en geles de poliacrilamida. Actualmente estamos analizando las secuencias de los distintos transcritos. Resultados preliminares indicarían que el exón 2 de p16 estaría ausente en uno de los transcritos. Además estamos tratando de establecer alguna correlación entre la aparición de las distintas bandas con alguna característica del tumor.

- 181. Análisis de la frecuencia de distribución de las subclases de alelos de clase 1 del VNTR del gen de la insulina. Su aporte a la predisposición a diabetes tipo 1.** Gloria Cerrone(1), Ariel P. López(1), Maximiliano Wilda(1), Valeria Denninghoff(1), Gustavo Frechtel(1), Héctor M. Targovnik(1).

(1)Cátedra de Genética y Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.B.A.
mailto:gcerrone@ffyb.uba.ar

El VNTR del gen de la insulina, se clasifica de acuerdo al número de repeticiones (UR) en tres tipos de alelos: clase 1, clase 2 y clase 3. Previamente hemos corroborado la asociación de alelos de clase 1 con susceptibilidad y de alelos de clase 3 con protección al desarrollo de diabetes tipo 1 (DM1). El objetivo de este trabajo fue la determinación del número exacto de repeticiones y la frecuencia de distribución de las variantes polimórficas o subclases del alelo 1 para determinar su aporte de predisposición a DM1. Se analizó una población de 50 individuos normales, 50 diabéticos tipo 1 y 25 familiares de primer grado. La subpoblación de muestras con alelos de clase 1 se estudió por amplificación de la región polimórfica por PCR y evaluación en geles de agarosa al 2.5%. Se observaron 23 tipos de alelos clasificados de acuerdo al número de repeticiones en 1S, 1M y 1L. Los individuos diabéticos presentaron una clara distribución trimodal. En los individuos normales se observó una distribución homogénea del número de repeticiones y una preferencia de alelos de subclase 1M con una muy baja incidencia de alelos 1S, mientras que en los individuos familiares se observan alelos de tipo 1S y 1M preferencialmente. En conclusión, para la población estudiada el análisis de frecuencias genotípicas y alélicas reafirma al alelo de clase 1 en su asociación a la predisposición a DM1, la cual no está determinada por ninguna de las diferentes subclases de alelos de clase 1 en particular.

- 182. Inserción/Deleción polimórfica de 1464 pares de bases en el Gen de la Tiroglobulina Humana..** Christian M. Moya(1), Viviana Varela(1), Carina M. Rivolta(1), Fernando M. Mendive(1), Héctor M. Targovnik(1).

(1)Facultad de Farmacia y Bioquímica.
mailto:cmmoya@huemul.ffyb.uba.ar

El gen de la Tiroglobulina Humana (TG) se ubica en el brazo largo del cromosoma 8 y su tamaño es de 270Kb. Al determinar la organización estructural de la TG, se encontró que una parte de nuestras secuencias no presentaba homología con las bases de datos presentes en GenBank, por lo que se continuó con la secuenciación de esa región y posterior análisis poblacional. De esta forma se encontró un polimorfismo bialélico que consiste en una Inserción/Delección de 1464 nucleótidos ubicado a 83 bases del inicio del intrón 18. Dicho polimorfismo está presente en la población, y en una muestra de 50 individuos analizada, se encontraron 18 homocigotas para la Inserción (I/I), 12 homocigotas para la Delección (D/D) y 20 heterocigotas (I/D). La frecuencia de ambos alelos en la muestra es de: 0,56 para la Inserción y 0,44 para la Delección, con la siguiente frecuencia genotípica: I/I=0,36; I/D=0,4; D/D=0,24. A pesar de que la cantidad de heterocigotas es baja, la diferencia no es significativa ($p=0,5$). Debido a la alta frecuencia de dicho polimorfismo creemos que no está asociado a patología tiroidea. La secuenciación de individuos homocigotas confirmó el sitio y la secuencia de los extremos de la Inserción/Delección. A partir de estos resultados proyectamos analizar diferentes grupos étnicos para estudiar movimientos migratorios, el posible origen evolutivo, su relación con otros marcadores polimórficos intragénicos y su presencia en otros mamíferos.

183. Correlación clínica y molecular de los síndromes de Prader-Willi y Angelman. Sebastian Esperante(1), Daniel Borelina(1), Liliana Francipane(1), Irene Szijan(1).

(1)*Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.*
sesperan@ffyb.uba.ar

Los síndromes de Prader-Willi (PWS) y Angelman (AS) son enfermedades neurogenéticas caracterizadas por un retardo mental, psicomotor y de crecimiento. Ambos presentan alteraciones moleculares en la región 15q11-13, donde se describieron varios genes que tienen expresión monoalélica parental específica (imprinting genómico). Aproximadamente un 70 % de los pacientes de PWS y AS tienen una delección de la zona 15q11-13, en el cromosoma paterno en PWS, y el materno en AS. Existen casos de disomía uniparental materna en PWS (25%) y paterna en AS (5%). Se analizaron pacientes con diagnóstico presuntivo de PWS y de AS mediante Southern Blot (SB) y PCR metilación específica (MS-PCR). El SB se realizó utilizando ADN genómico de los pacientes digerido con Hind III y Hpa II, e hibridando con la sonda PW71B. La MS-PCR se realizó modificando químicamente el ADN genómico y amplificando con primers alelo específicos para el gen SNRPN. Estas técnicas detectan un 98% de los mecanismos moleculares asociados a PWS y un 70% en AS. De 28 pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de PWS, 12 presentaron alteraciones moleculares y de 14 con clínica presuntiva de AS, solo 2 de ellos. Los resultados sugieren que en la mayoría de los pacientes, el diagnóstico clínico no fue confirmado por los ensayos moleculares. Esto demuestra la importancia del análisis molecular, para un diagnóstico seguro de las enfermedades y poder diferenciarlas de otros síndromes con sintomatología clínica similar.

184. Polimorfismo del gen del receptor de vitamina D y del gen del receptor de estrógenos en mujeres postmenopáusicas sanas y osteoporóticas de la ciudad de Córdoba. Adriana V. Pérez(1), Miriam Binci(1), María R. Ulla(2), María A. Rivoira(2), Beatriz García(1), Nori Tolosa de Talamoni(1).

(1)*Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencia Médicas, U. N. C.* (2)*Centro de Endocrinología, Osteología y Metabolismo*
mailto:aperez@biomed.uncor.edu

En este estudio se analiza el polimorfismo del gen del receptor de estrógenos (RE) y el de vitamina D (RVD) en relación con la densidad mineral ósea (DMO) y los valores séricos del procolágeno amino terminal (PINP) marcador de formación ósea

procedente del metabolismo del colágeno. Se utilizó una muestra poblacional de la ciudad de Córdoba, 100 mujeres postmenopáusicas (50 sanas y 50 osteoporóticas vírgenes de tratamiento). Se obtuvo el ADN de sangre entera y mediante el uso de primers específicos se amplificó el segmento deseado por PCR, el cual fue cortado con la restrictasa BsmI (para RVD) o con las restrictasas PvuII y XbaI (para el RE). Los genotipos PP, XX y BB representan los homocigotas sin sitios de restricción, los genotipos pp, xx y bb, homocigotas con sitios de restricción y Pp, Xx y Bb son heterocigotas. El PINP se dosó en suero por RIA. Los resultados no mostraron diferencias en la distribución de las frecuencias genotípicas tanto para el gen de RVD como para el del RE entre la población sana y la osteoporótica. No se observó correlación entre la DMO y los genotipos estudiados. El marcador óseo PINP presentó valores significativamente altos en la población osteoporótica, especialmente en aquella que poseía genotipos BB para el RVD y pp y xx para el RE. En conclusión, los resultados indican que las mujeres osteoporóticas con genotipos BB y /o pp xx tienen mayor recambio óseo, lo cual representa un pronóstico negativo para el curso de la enfermedad.

NEUROCIENCIAS III

185. Interferencia de la consolidación de una respuesta de evitación condicionada por estimulación histaminérgica del hipocampo ventral en la rata. Edgardo O. Alvarez(1), Arturo M. Banzan(1).

(1)*UNEFECO, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.*
mailto:ealvarez@fmed2.uncu.edu.ar

Anteriormente se han presentado evidencias que la histamina en el hipocampo ventral interfiere con la adquisición de una respuesta de evitación condicionada. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la imidazolamina, además podría afectar la consolidación de la respuesta. Para ello, se usaron ratas macho adultas implantadas con cánulas de microinyección en el hipocampo ventral. Diferentes grupos se entrenaron en 2 sesiones (8 ensayos c/u) para aprender la evitación de un golpe de corriente en las pata anunciada por un tono de ultrasonido por 30 s. Al finalizar la 2da sesión, los animales se inyectaron con 9 nmol ($n=12$), 45 nmol ($n=10$) o 90 nmol de histamina ($n=14$). 24 h después, en una tercera sesión, se evaluó la latencia de escape y el % de respuestas correctas (% CAR) de las ratas tratadas. Salino se consideró control. Los resultados mostraron que la latencia de escape fue afectada solamente en los primeros ensayos por el tratamiento (31.6 ± 3.2 s Vs 8.2 ± 4.2 s; ensayo 2, histamina 9 nmol Vs salino, $p < 0.01$). En cambio, en el % CAR, la estimulación histaminérgica inhibió la evocación en todas las dosis utilizadas a partir del ensayo 2 (33.3 ± 8.8 % Vs 66.7 ± 8.3 %, ensayo 3, histamina 9 nmol Vs salino). Los resultados confirman la acción inhibitoria de la histamina y sugieren una acción en la consolidación.

186. Deterioro Cognitivo Leve: valor pronóstico de las intrusiones en la conversión a demencia tipo Alzheimer (DTA). Paula Harris(1), Marina Drake(2), Carlos Nagle(1), Ricardo Allegri(1).

(1)*CEMIC /CONICET* (2)*Hospital Británico*
pharris@speedy.com.ar#http://pharris@speedy.com.ar#

La producción de intrusiones durante el aprendizaje de una lista de palabras ha sido considerada como un marcador sensible de una demencia tipo Alzheimer (DTA) incipiente. Existen evidencias de que algunos sujetos con deterioro cognitivo leve (DCL) se convierten en dementes (15% anual) y otros no. Objetivos: 1) realizar un seguimiento de los pacientes con DCL con (DCL-1) y sin (DCL-2) intrusiones en la evaluación basal de la memoria episódica; 2) estudiar la tasa de conversión a DTA de cada grupo. Metodología: 30 sujetos con DCL apareados por edad y escolaridad, subdivididos de acuerdo a la presencia (15/30) o ausencia (15/30) de intrusiones durante el aprendizaje de una lista de palabras, fueron estudiados y seguidos durante 1,5 a 2 años. Para observar la evo-

lución durante el seguimiento, se les efectuó una batería neuropsicológica extensa. Resultados: no hubo diferencias significativas en el rendimiento mnésico basal de los pacientes estudiados. La cantidad de sujetos con DCL-1 que evolucionó hacia una DTA (12/15) fue significativamente mayor ($p = 0,001$) que los que no habían producido este tipo de errores (1/15). Conclusiones: los pacientes con DCL que habían producido intrusiones en los tests de memoria (DCL-1) presentaron una tasa de conversión significativamente mayor que aquellos que no las habían producido (DCL-2). Esto refleja la importancia de las mismas en el examen basal, como valor pronóstico de conversión a DTA.

187. La administración central de Interferon gamma modifica la actividad del reloj en el hamster dorado. Verónica I. Boggio(1), Santiago Perez Lloret(1), Patricia O. Castrillón(2), Patricia Riccio(1), Ana I. Esquifino(2), Daniel P. Cardinali(1), Rodolfo A. Cutrera(1).

(1)Laboratorio de Neurociencias, Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, Universidad de Buenos Aires (2)Depto. de Bioquímica y Biología Molecular III. Fac. de Medicina, Universidad Complutense, Madrid
mailto: cardinal@mail.retina.ar

El reloj circadiano, ubicado en los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos, regula numerosos ritmos fisiológicos y comportamentales. Su actividad puede ser modificada por estímulos fóticos y no fóticos. Entre los últimos, no se conoce al presente el efecto de la administración central de citoquinas como el interferón gamma (IFN γ) sobre la actividad. Para ello, hámsters dorados (machos, adultos; $n=7$ en cada grupo) fueron alojados en jaulas individuales con libre acceso a una rueda bajo un fotoperíodo 14:10 luz-oscuridad. Se inyectó IFN γ o su solvente (solución salina) a ZT 6 ó 18, tomando por convención a ZT 12 como el comienzo de la noche (período de actividad), a través de una cánula implantada en el tercer ventrículo. La actividad de rueda fue monitoreada continuamente (Dataquest III-Minimitter, Circadia). La administración de IFN γ a ZT 6 produjo un adelanto en la acrofase del ritmo de 25 minutos con respecto al control junto con una reducción del mesor: $22.51 \pm 11.21\%$ y $30.73 \pm 7.11\%$ (media \pm SEM) a ZT 6 y 18 respectivamente. Además, se observó una reducción en la amplitud, que no alcanzó significación estadística. Respecto de los comienzos de la actividad (onsets), las inyecciones no produjeron ninguna modificación. Esta es la primera vez que se demuestra que una molécula inmunológicamente activa como el IFN γ es capaz de modificar significativamente la actividad íntima del reloj endógeno, en un animal fotoperiódico como el hámster dorado.

188. Relación entre conductas y niveles de cortisol plasmático y fecal en monos capuchinos (Cebus apella) en cautiverio. Paula Harris(1), Mónica Lahoz(2), Ricardo Allegrí(1), Carlos Nagle(1).

(1)CEMIC / CONICET (2)CEMIC
pharris@speedy.com.ar#http://pharris@speedy.com.ar#

El comportamiento de primates en cautiverio y su relación con niveles de cortisol, ha sido estudiado, hipotetizándose una correlación entre ambos parámetros. Debido a que el primate *Cebus apella* presenta niveles elevados de cortisol, el objetivo fue determinar si estos correlacionaban con la expresión de comportamientos específicos. Se registraron conductas de 17 monos *Cebus apella* (7M-10 F, 4 a 28 años) alojados en jaulas individuales en la colonia del CEMIC. Las observaciones se realizaron durante 20 minutos, 3 veces por semana a lo largo de 2 meses. A continuación se tomaron 2 muestras de materia fecal (1 a la mañana antes de la extracción de sangre y 2 a las primeras horas de la tarde del mismo día) y una muestra de sangre. El cortisol en plasma osciló entre 12 y 164 ug/100ml, y entre 1,5 y 56 ug/g en materia fecal. Hubo un incremento mayor al 100% en el cortisol fecal post-extracción de sangre respecto del basal. Las conductas que se expresaron con mayor frecuencia fueron: atención (18,24%) exploración (13,25%) pacing (12,68%) quietud (12,60%) locomoción

(12,24%).Excepto la conducta de 'autoagresión' ($r = 0,65$) no se observaron correlaciones significativas entre las demás conductas y los valores de cortisol. A diferencia de otros autores, no encontramos correlación entre los parámetros estudiados. La gran variabilidad en los valores de cortisol, sugiere que éste es sensible a factores como el estado adaptativo y la respuesta de estrés por la extracción de sangre.

189. Desarrollo de un modelo de hipertensión ocular en ratas. Julieta Campanelli(1), Lucio P. Nahum(1), Jorge L. Benozzi(1), Ruth E. Rosenstein(1).

(1)Dpto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, U.B.A.
mailto:ruthr@fmed.uba.ar

La matriz extracelular del trabeculado constituida esencialmente por glicosaminoglicanos (GAGs), contribuye significativamente como barrera al pasaje de humor acuoso. Se ha demostrado que el ácido hialurónico (AH) es el GAG más abundante en el trabeculado humano y que la hialuronidasa exógena disminuye la resistencia al flujo acuoso. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo de hipertensión ocular en ratas, a través de la administración intracameral de AH. El AH fue inyectado en un ojo de cada rata, en tanto que el ojo contralateral se inyectó con solución salina. La presión intraocular (PIO) fue determinada mediante un TonoPen XL. Una inyección única de AH (25 microl, 1%) indujo un aumento de la PIO que se mantuvo o largo de 5 días. Aunque luego se observó una caída lenta de este parámetro, la PIO permaneció significativamente elevada hasta el octavo día. La administración crónica (una vez/semana) de AH indujo una elevación persistente de este parámetro que se extendió a lo largo de todo el estudio (10 semanas). La hipertensión inducida por AH fue revertida por diversas terapias anti-glaucomatosas de uso humano frecuente: el timolol, la brimonidina y el latanaprost. Asimismo, hemos demostrado que existen variaciones diarias significativas con un perfil similar en la PIO de ojos controles y tratados con AH. En conjunto, estos resultados demuestran que la administración intracameral crónica de AH podría constituir un nuevo modelo de hipertensión ocular en ratas.

190. Alteraciones visuales en pacientes argentinos tratados con vigabatrina. Carolina O. Jaliffa(1), Ruth E. Rosenstein(1), Lucio P. Nahum(1), Silvia Kochen(2), Brenda Giagante(2), Patricia Saidón(2), Jorge L. Benozzi(1).

(1)Dpto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA (2)Centro Municipal de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía
mailto:cjaliffa@fmed.uba.ar

La Vigabatrina (VGB) es una droga antiepiléptica altamente efectiva que aumenta selectivamente los niveles de ácido g-aminobutírico (GABA) inhibiendo su degradación. En forma reciente se han descrito constricciones del campo visual en pacientes de diversos países tratados con esta droga. Este estudio no se había realizado con anterioridad en nuestro país. El objetivo de este trabajo fue examinar las funciones visuales en 17 pacientes tratados crónicamente con VGB. Cinco pacientes tratados con carbamazepina se utilizaron como control. Los campos visuales fueron realizados por perimetría de 60° (campímetro de Humphrey) y se realizaron electrorretinogramas (ERG) en todos los pacientes. Ninguno de los pacientes refirió síntomas visuales, sin embargo todos ellos mostraron una constricción periférica significativa que no se observó en los controles. Asimismo, en todos los pacientes tratados con VGB se observó una disfunción retiniana bilateral con una marcada alteración electrorretinográfica. En el ERG escotópico se observó una disminución significativa de la amplitud de la onda b mientras que en el ERG fotópico todos sus componentes se encontraron disminuidos. No se observaron diferencias en los potenciales visuales evocados, en la visión de color o en el fondo de ojo. En suma, estos resultados avalan la existencia de una relación causal entre el tratamiento con VGB y

un pattern específico de constricción bilateral del campo visual así como una disminución en la onda b del ERG.

- 191. La exposición de células nerviosas al aluminio (Al) altera la actividad y expresión de la óxido nítrico sintetasa (NOS).** Carlos A. Lafourcade(1), Graciela Garbossa(1), Claudia Pérez Leirós(1), Alcira Nesse(1).

(1)Depto Química Biológica, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires
mailto:charly@qb.fcen.uba.ar

Se ha sugerido que los efectos neurotóxicos del Al están relacionados con la producción de radicales libres, y, por lo tanto, con el estado redox de las células. El objetivo de este trabajo es dilucidar la toxicidad del metal asociada a estos mecanismos; para ello nos proponemos estudiar su efecto sobre la NOS, teniendo en cuenta su papel en condiciones fisiológicas y como mediador en la producción de radicales libres. Utilizamos dos modelos experimentales; una línea de neuroblastoma humano (SHSY5Y) cultivadas por 4 días en presencia de cloruro de Al 100 μ M, y células del sistema nervioso de ratones (BALB/c machos) obtenidas luego de un máximo de 50 días de administración de citrato de Al 5 mM en el agua de bebida. La expresión de NOS fue estudiada por inmunoblotting y su actividad por la conversión de 14C-arginina a 14C-citrulina. Nuestros resultados muestran una disminución en la actividad de las isoformas constitutivas de NOS inducida por Al (% de inhibición SHSY5Y = 22.6 ± 5.1 , n=5; cerebelo: 34.2 ± 5.7 , n=5). Por otro lado los ensayos de inmunoblotting muestran cambios en la expresión de la isoforma nNOS tanto en las células de neuroblastomas como en el cerebelo e hipocampo de los ratones tratados con Al, sin cambios en iNOS y eNOS. Teniendo en cuenta estos resultados podemos concluir que el Al induce una disminución en la actividad de la NOS, así como cambios en el patrón de expresión de la nNOS; que podrían contribuir a una acción pro-oxidante del metal.

- 192. Alteraciones neurológicas estructurales y ultraestructurales inducidas por la asfisia perinatal. Efecto de la hipotermia durante la isquemia.** Elisa Cebral(1), Francisco Capani(1), Asia Selvín-Testa(1), Juan J. López-Costa(1), María E. López(1), César F. Loidl(1), Jorge Pecci-Saavedra(1).

(1)Instituto de Biología Celular y Neurociencias. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires
mailto:ecebral@hotmail.com

La asfisia perinatal (AP) induce alteraciones conductuales y estructurales- bioquímicas en el SNC. Para estudiar los efectos cerebrales de la AP a largo plazo, úteros de rata con fetos a término fueron extraídos y colocados en agua a 37°C durante 19 min. (AP moderada) o 20 min (AP severa). A los 45 días de edad se estudiaron, en neocórtex y corteza cerebral, los cambios en la nNOS (óxido nítrico sintasa neuronal), NF de 200 kD (neurofilamentos) y la GFAP (proteína gliofibrilar ácida), mediante inmunocitoquímica (microscopía óptica (MO) y electrónica (ME)). Al MO observamos en los animales asfícticos citomegalia de neuronas nNOS (+) junto con engrosamiento dendrítico. El incremento de inmunotinción para NF 200 kD de los axones y GFAP en las áreas analizadas, en la asfisia severa, sugirió cambios neurodegenerativos e hipertrofia astrogliar. Estas alteraciones fueron confirmadas al ME. Los animales tratados con AP en condiciones de hipotermia (20 min AP, 15°C), presentaron inmunomarcación y ultraestructura similar a los controles. En conclusión, la AP severa induciría cambios neuronales y astrogliales, posiblemente a través de una cascada de eventos en que el exceso de óxido nítrico contribuiría a la inducción de daño cerebral. La AP en condiciones de hipotermia tendría un efecto neuroprotector frente al desencadenamiento de alteraciones cerebrales a largo plazo.

- 193. El patrón global de actividad cortical modula el potencial de membrana de las neuronas estriatales.** Fernando

Kasanetz(1), Kuei-Yuan Tseng(2), Luis A. Riquelme(1), Mario G. Murer(1).

(1)Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (2)Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA y Albany Medical College, NY, USA.
mailto:neurofis@fmed.uba.ar

Las neuronas estriatales (NEMs) reciben una fuerte inervación cortical excitatoria. En ratas anestesiadas, su potencial de membrana (Vm) alterna rítmicamente entre un estado hiperpolarizado y otro despolarizado (ED), durante el cual pueden disparar potenciales de acción. Se ha postulado que la ocurrencia de ED simultáneos en grupos de NEMs habilitaría la transferencia de información cortical a través de los ganglios basales durante la actividad conductual. Sin embargo, hemos demostrado que la fluctuación del Vm de las NEMs está correlacionada con ritmos lentos electrocorticográficos (ECoG) típicos del sueño y la anestesia. Durante la actividad cognitiva el ECoG se encuentra desincronizado (DES). Con el objetivo de estudiar las NEMs durante episodios de DES cortical, realizamos registros simultáneos del ECoG e intracelulares de NEMs en ratas anestesiadas con uretano, en las que el ECoG puede mostrar episodios breves de DES espontánea, o puede ser DES estimulando eléctricamente la región mesopontina. En todas las NEMs estudiadas (n=10), la fluctuación entre estados del Vm fue abolida durante los episodios de DES cortical, pasando el Vm a mostrar ritmos de baja amplitud y alta frecuencia. Estos resultados indican que propiedades de las NEMs que determinan su excitabilidad son fuertemente dependientes del patrón global de actividad ECoG, y sugieren que las hipótesis sobre procesamiento de información aferente por las NEMs durante actos conductuales deben ser revisadas.

- 194. Los Factores Neurotróficos modifican la captación neuronal de aminas.** María I. Rosón(1), Virginia Chirino(2), Martín Rodríguez Ferpép(3), Belisario E. Fernández(4).

(1)Conicet (2)CAECE (3)Facultad de Farmacia y Bioquímica (4)Facultad de Farmacia y Bioquímica-CONICET
mailto:befernan@ffybu.uba.ar

Introducción: los factores neurotróficos (FN) son proteínas endógenas que regulan el desarrollo y mantenimiento de neuronas y células gliales e intervienen en procesos de regeneración del sistema nervioso central (SNC). Asimismo se ha descrito que los FN regulan la plasticidad sináptica. Se describen 4 familias de FN: a) neurotrofinas, b) citoquinas neuropoyéticas, c) factores de crecimiento de fibroblastos y d) de transformación. Objetivo: estudiar los efectos agudos de diferentes FN sobre la neurotransmisión simpática en el SNC. Métodos: se determinó el efecto de FN sobre la captación neuronal de noradrenalina (NA) a los 5 minutos en hipotálamo de rata según la técnica descrita por Vatta y col. (Reg.Pep. 65, 1996). Resultados: los resultados preliminares (dpm/ mg prot \pm ES, n=5-10) muestran que el nerve growth factor (NGF) y el glial-derived neurotrophic factor (GDNF) disminuyeron significativamente ($p < 0.01$) la captación de NA respecto del control (2.56 ± 0.09 vs 3.80 ± 0.18 y 2.64 ± 0.09 vs 3.87 ± 0.20 respectivamente). A su vez, la interleuquina 6 (IL-6) aumentó la captación de NA ($p < 0.03$) respecto del grupo control (4.61 ± 0.10 vs 3.78 ± 0.26). Conclusión: los FN modifican la captación central de aminas pudiendo modular la neurotransmisión noradrenérgica y regular de esta manera la plasticidad sináptica. Los efectos opuestos observados pueden ser atribuidos a los diferentes receptores específicos sobre los que actúan.

- 195. La Endotelina 1 y 3 (ET-1 y ET-3) modula la liberación de noradrenalina (NA) en el hipotálamo anterior a través del receptor ETB y de la vía del óxido nítrico.** Andrea S. di Nunzio(1), María S. Jaureguiberry(1), Liliana G. Bianciotti(2), Marcelo S. Vatta(1).

(1)Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (2)Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
mvatta@ffybu.uba.ar

Diversos trabajos muestran que las neuronas catecolaminérgicas hipotalámicas presentan alta densidad de sitios receptores para ETs y una elevada expresión de mRNA. El objetivo del presente trabajo fue determinar los efectos de la ET-1 y ET-3 sobre la liberación neuronal de NA, así como también, los receptores y vías intracelulares involucradas en el hipotálamo anterior de ratas Sprague-Dawley macho (250-300g). Los estudios de liberación de NA se realizaron según Vatta y col. (Regul. Pept. 65, 175, 1996). Anteriormente se demostró que la ET-1 10nM y la ET-3 10nM disminuyen la liberación de neuronal NA en el hipotálamo anterior. La respuesta inducida por ambas ETs en el hipotálamo anterior se bloqueó por el antagonista del receptor ETB, BQ-788 100nM (BQ-788, 0.9 ± 0.05 vs BQ-788+ ET-1, 0.9 ± 0.06 y BQ-788+ET-3, 0.87 ± 0.07). Tanto el L-NAME 10uM, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, como el azul de metileno (MeB) 10uM, un inhibidor de la guanilato ciclasa, bloquearon el efecto inhibitorio de ambas ETs sobre la liberación de NA en el hipotálamo anterior (L-NAME, 0.95 ± 0.07 vs L-NAME+ET-1, 0.99 ± 0.03 y L-NAME+ET-3, 0.94 ± 0.05 ; MeB, 0.98 ± 0.04 vs MeB+ET-1, 0.97 ± 0.03 y MeB+ET-3, 0.92 ± 0.01). * $p < 0.05$ (ANOVA y 't' test modificado por Bonferroni); n = 5-9. Nuestros resultados demuestran que ambas ETs tienen un efecto neuromodulador inhibitorio sobre la liberación de NA en el hipotálamo anterior, el cual esta mediado por la activación del receptor ETB e involucra a la vía del óxido nítrico.

196. Determinación y caracterización de la enzima 3beta-hidroxiesteroide-deshidrogenasa/isomerasa (3b-HSD) en tejido nervioso. Héctor Coirini(1), Monique Gouézou(2), Philippe Liere(2), Brigitte Delespierre(2), Michael Schumacher(2), Rachida Guennoun(2).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental - Dpto. Bioquímica Humana, Fac. Medicina, UBA (2)INSERM - U488, Le Kremlin-Bicêtre, Francia hcoirini@dna.uba.ar

Los niveles de progesterona (Prog) en el nervio ciático son mayores que en el plasma y se ha sugerido que esto se debe a una síntesis local de este esteroide. Prog estimula la remielinización del nervio luego de una injuria y se sintetiza por acción de la 3b-HSD a partir de pregnenolona (Preg). Nuestro objetivo fue demostrar la presencia de esta enzima y caracterizar su actividad en el nervio ciático. Se utilizó 3H-Preg como sustrato y NAD⁺ como cofactor. Los niveles de esteroides formados se calcularon por extrapolación de la relación entre los picos radioactivos, obtenidos por cromatografía en placa delgada o por determinación con espectrometría de masa. Un rápido aumento en la formación de Prog fue observada en homogenatos del tejido dentro de la primera hora de incubación. Se observó una dependencia lineal con la concentración de NAD⁺; el valor de Km calculado (1.06 ± 0.2 uM) fue similar al descripto para la isoforma Tipo I. El agregado de trilostano, un inhibidor competitivo de esta enzima, provocó una reducción significativa en la formación de Prog (IC₅₀= 4.06 ± 2.58 uM). Se evaluó el efecto de diferentes esteroides sobre la actividad de la 3b-HSD. Solo estradiol y testosterona produjeron una inhibición significativa en concentraciones similares a la del sustrato ($p < 0,05$). Estos estudios demuestran la presencia de una actividad enzimática productora de esteroides en el nervio, fortaleciendo la hipótesis de una acción local de éstos, en los procesos de regeneración nerviosa.

PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR II

197. Caracterización de la actividad del coactivador TIF-2 sobre GR y NF-kB. Ignacio M. Nojek(1), Lorena Franco(1), Luciana Tonelli(1), Mónica A. Costas(1).

(1)Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN-UBA mailto: inojek@bg.fcen.uba.ar

En trabajos anteriores propusimos un mecanismo de antagonismo entre citoquinas y glucocorticoides por competencia en la

unión a coactivadores de GR y NF-kB. Demostramos que los coactivadores de la familia p160 del GR también son coactivadores de NF-kB, promoviendo la actividad transcripcional de ambos factores, en forma dosis coactivador dependiente. Con el objeto de determinar si TIF-2, un coactivador de GR y NF-kB, constituye una molécula por la cual compitan ambos factores, o bien podría formar parte de un complejo capaz de aumentar la transactivación por ambos factores, se analizó 1) dominios de TIF-2 involucrados, transfectedando células HeLa con vectores conteniendo delecciones del coactivador y 2) si además de la actividad histona acetil transferasa previamente descripta para estos coactivadores existía alguna otra actividad enzimática asociada. Se observó 1) que determinados dominios del coactivador aumentan la actividad transcripcional de uno y no la del otro factor, 2) que TIF-2 recluta actividad quinasa, ya que inmunoprecipitados con anticuerpos específicos para TIF-2 presentan un patrón específico de bandas cuando es incubado con ATP marcado radioactivamente. Esto sugiere que de existir competencia entre GR y NF-kB por la unión a TIF-2, los dominios requeridos son diferentes y no se descarta la formación de complejos conteniendo: TIF-2/GR/NF-kB. Los complejos llevando TIF-2 reclutan actividad quinasa, posiblemente involucrada en la regulación de la transcripción.

198. Alteraciones metabólicas producidas por arsénico en macrófagos alveolares in vitro. Mónica Palmieri(1), Deborah Tasat(2), Beatriz Molinari(3).

(1)Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (2)Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad de General San Martín (3)Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas, Comisión Nacional de Energía Atómica mailto:Palmieri@cnea.gov.ar

El arsenito de sodio (As) disminuye la incidencia tumoral en modelos de cáncer experimental en ratones, relacionado probablemente con la disminución del metabolismo oxidativo en células inflamatorias. En este trabajo analizamos in vitro aspectos del metabolismo celular asociado a procesos redox en macrófagos alveolares (MA) tratados con (As). En cultivos de MA se evaluaron: la viabilidad celular, la actividad específica de la formazana (densidad óptica por célula/area), el porcentaje de células con endosomas reactivos y el de células con cristales de formazana.

A)	%viabilidad celular tiempo (hs)	actividad específica				
		24	24	48	72	96
control	90	2,2	2,8	3,5	3,8	3,8
As 1,25 uM *	90	1,9	2,3	3,5	3,8	3,8
As 5 uM *	51	1,6	1,6	3,1	2,7	2,7

*Estadísticamente significativos con respecto al control ($p > 0,05$)

B) El porcentaje de células con endosomas activos (As:1,25-5 uM) no varió con respecto al porcentaje de las células control. Se puede concluir que la disminución de los procesos redox de los MA aquí descripto y de otras células inflamatorias tratadas in vitro con As podría afectar la regulación del número de tumores en animales experimentales intoxicados con arsénico.

199. Los niveles relativos de proteínas Bcl-X son afectados por la actividad de MAPKs. Luciana Rocha Viegas(1), Alfonso J. Soler Bistué(1), Lino S. Barañao(2), Miguel Beato(3), Omar A. Coso(4), Adalí Pecci(1).

(1)Departamento Química Biológica, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Buenos Aires (2)Instituto Biología y Medicina Experimental, Consejo Investigaciones Científicas y Tecnológicas (3)Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, Alemania (4)Laboratorio Fisiología y Biología Molecular, Facultad Ciencias Exactas y Naturales UBA

Las MAPKs se asociaron con procesos como proliferación, diferenciación o muerte celular. Se tiende a ligar la activación de

Erk1/2 con la supervivencia celular y altos niveles de JNK o p38 (SAPKs) con apoptosis. Así, un balance entre las actividades de Erk1/2 y SAPKs influirían el destino celular. Los productos del gen bcl-X son intermediarios en la transducción de señales que regula la apoptosis. Las dos isoformas que genera tienen funciones opuestas: Bcl-XL (antiapoptótico) y Bcl-XC (proapoptótico). Se demostró una correlación entre la abundancia relativa de estas proteínas y la apoptosis en células RENTROP (epitelio uterino de rata). El objetivo fue analizar el efecto de EGF en el control de la expresión de las dos isoformas de bcl-X. Ensayos de RT-PCR semicuantitativa realizados con ARNm obtenidos de células incubadas con EGF mostraron una reversión en la relación Bcl-XL/Bcl-XC (EGF=0.8; Control=15.8). Este efecto se inhibió con el bloqueante PD90589 y por dexametasona y progesterona (inhibidores de la apoptosis en RENTROP). Ensayos del gen reportero luciferasa bajo el control del promotor de bcl-X mostraron que la actividad del promotor P2 se inhibió con EGF (Trat./Ctrl = 6 ± 0.1). Estos resultados se confirmaron por RT-PCR realizadas con primers específicos. Nuestros resultados sugieren que EGF podría controlar la apoptosis a través de la regulación de la expresión de bcl-X mediante un mecanismo en el cual participarían MAPKs en un escenario de complejidad creciente.

200. Regulación de la expresión de Bax durante la apoptosis inducida por dexametasona en timocitos de ratón. Esteban Hoijman(1), Luciana Rocha Viegas(1), Ruth E. Rosenstein(2), Adalí Pecci(1).

(1)Departamento Química Biológica, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (2)Laboratorio Neuroquímica y Oftalmología Experimental, Facultad Medicina, Universidad Buenos Aires esteban@ce.fcen.uba.ar

La involución del timo mediada por glucocorticoides fue uno de los primeros eventos asociados al proceso de apoptosis. Los miembros de la familia Bcl-2 fueron propuestos como componentes relevantes, reguladores de la muerte y supervivencia celular y como factores 'blanco' de diversos estímulos apoptóticos. El objetivo de este trabajo fue analizar el patrón de expresión de estas proteínas en respuesta al tratamiento con dexametasona en cultivos primarios de timocitos de ratón. Mediante ensayos de western blot se determinaron los niveles de Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XC y Bax. Los resultados indican que la dexametasona, luego de 2 h. de incubación, aumentó los niveles de Bax respecto al control (Dex/Control = 2.1 ± 0.3), en tanto que los niveles de las demás proteínas no se modificaron. Ensayos de RT-PCR semicuantitativa demostraron que la dexametasona aumentó los niveles del ARNm de bax luego de una hora de incubación (Dex/Control = 1.7 ± 0.4). Se ha descrito que el factor de transcripción p53 regula la expresión de algunos miembros de la familia Bcl-2; por lo tanto se analizaron los niveles de esta proteína. Los resultados demuestran que la expresión de p53 no varía en presencia de la hormona. En suma, estos resultados permiten postular a la proteína Bax como un intermediario de la inducción de apoptosis dependiente de glucocorticoides. Su expresión podría estar inducida por la hormona a través de un mecanismo independiente de la inducción de p53.

201. Mecanismos mitocondriales involucrados en la apoptosis inducida por el virus de la estomatitis vesicular. Ximena Perfetti(1), Felix C. Coulombié(1), Patricia Gadaleta(1).

(1)Depto Química Biológica, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires ximeper@yahoo.com

El virus de la estomatitis vesicular (VSV) induce apoptosis en distintas células de mamíferos. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la intervención del sistema de caspasas, como así también la presencia y modulación de diversas proteínas pro- y anti-apoptóticas durante la apoptosis inducida por dicha infección viral en cultivos de células Vero. En este trabajo se investigaron los eventos mitocondriales asociados

a dicho proceso. Estudios preliminares nos han indicado que la apoptosis que se observa en las células Vero durante la infección con el virus VSV se desencadena tempranamente dentro del ciclo viral. Para abordar el estudio a nivel mitocondrial hemos analizado los cambios en el potencial de membrana mitocondrial mediante un fluorocromo específico (MitoCapture, Alexis Biochem.) el cual mediante fluorescencia permite discriminar dichos cambios, los cuales fueron detectados a partir de 1 hora postinfección. Además, empleando anticuerpos monoclonales anti-citocromo C (Cit. C) y anti-AIF (Factor inductor de apoptosis), hemos observado que tanto el Cit. C como el AIF se liberan de la mitocondria y translocan al citosol (Cit. C) y al núcleo (AIF), tempranamente a partir de la primera hora postinfección. Estos experimentos nos permiten concluir que la mitocondria juega un papel central en el proceso apoptótico que sufre la célula infectada por VSV.

202. Efecto de la prostaglandina E2 (PGE2) sobre la actividad celular adenohipofisaria. Papel del óxido nítrico (NO).

Jimena P. Cabilla(1), Ariel H. Benitez(1), Cristian C.A. Bodo(1), Miguel O. Velardez(1), Beatriz H. Duvilanski(1).

(1)Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires <mailto:neuroend@fmed.uba.ar>

Las PGs, así como también el NO, intervienen en un número de procesos biológicos involucrados en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Previamente demostramos que el NO estimula la actividad de COX en la adenohipofisis. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la PGE2 sobre la proliferación celular en cultivos provenientes de ratas hembras, y la posible participación del NO en dicho efecto. Como índice de viabilidad se midió la actividad deshidrogenasa mitocondrial (AC, método de MTT). Las células fueron incubadas durante 24 y 48 hs con concentraciones crecientes de PGE2. La PGE2, en concentraciones de 10-7 M y mayores, disminuyó la AC (absorbancia a 600 nm) (Control: 0.350 ± 0.009 , PGE2 10-8 M: 0.333 ± 0.011 , PGE2 10-7 M: $0.304 \pm 0.011^*$, PGE2 10-6 M: $0.175 \pm 0.005^{***}$, PGE2 10-5 M: $0.033 \pm 0.002^{***}$, n=8, $p < 0.01$, $^{***}0.001$ vs Control). La hemoglobina (Hb, 10-5M), un secuestrador de NO, no modificó la AC (Control: 0.350 ± 0.013 , 0.323 \pm 0.006, n=8), sin embargo revirtió parcialmente el efecto de la PGE2 (AC): PGE2 10-8 M: 0.343 ± 0.007 , Hb+PGE2 10-8 M: 0.320 ± 0.004 , PGE2 10-7 M: $0.313 \pm 0.007^*$, Hb+PGE2 10-7 M: $0.340 \pm 0.008^{\wedge}$, PGE2 10-6 M: $0.145 \pm 0.005^{***}$, Hb+PGE2 10-6 M: $0.268 \pm 0.008^{\wedge}$, n=8, $^*p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ vs Control, $^{\wedge}p < 0.01$, $^{\wedge}p < 0.001$ vs las respectivas PGE2. Estos resultados demuestran por primera vez un efecto citotóxico de la PGE2 sobre las células adenohipofisarias y sugieren una participación del NO en dicho efecto.

203. Papel protector del óxido nítrico (NO) en el efecto citotóxico del cadmio sobre las células adenohipofisarias.

Ariel H. Benitez(1), Cristian C.A. Bodo(1), Jimena P. Cabilla(1), Miguel O. Velardez(1), Beatriz H. Duvilanski(1).

(1)Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires <mailto:neuroend@fmed.uba.ar>

El Cadmio (Cd2+), in vivo e invitro, afecta al sistema endócrino. Sin embargo, poco se conoce sobre su mecanismo de acción a nivel adenohipofisario. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto del Cd2+ sobre la viabilidad celular en cultivos de células adenohipofisarias de ratas machos. Como índice de viabilidad se midió la actividad deshidrogenasa mitocondrial (AC, método de MTT). Las células fueron incubadas durante 48 hs con concentraciones crecientes de CdCl2. El Cd2+ disminuyó la AC (Absorbancia 600 nm) a concentraciones iguales o mayores de 10 microM. (Control: 0.239 ± 0.020 ; Cd2+ 1 microM: 0.252 ± 0.009 ; Cd2+ 10 microM: $0.175 \pm 0.011^{***}$; Cd2+ 25 microM: $0.096 \pm 0.005^{**}$ $p < 0.01$ vs control). DETA NONOato (DETA/NO, 0.1 mM), un dador de NO, revirtió el efecto del Cd2+ (Control: 0.231 ± 0.007 ; Cd2+ 25 microM: $0.083 \pm 0.010^{***}$; DETA/NO 0.1 mM: $0.289 \pm$

0.014^{^^}; Cd2+ + DETA/NO: 0.128 ± 0.006^{***}, ^{^^}, ^{***} p<0.001 vs respectivo control sin Cd, ^{^^} p<0.01 ^{^^} p<0.001 vs respectivo control sin DETA/NO). L-NAME, inhibidor de la NO sintasa, y Hb, un secuestrador de NO, potenciaron la disminución de la actividad celular inducida por el Cd2+. Estos resultados muestran un efecto citotóxico del Cd2+ sobre las células adenohipofisarias y sugieren que el NO ejercería un papel citoprotector atenuando el efecto del Cd2+.

204. Quimiorresistencia a doxorubicina dependiente de la confluencia en una línea celular mamaria murina normal.

Mariana Beviacqua(1), Marcela A. Sandoval(2), Juan C. Calvo(3).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, UBA (2)Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA (3)IBYME, CONICET, UBA y Depto. Qca. Biológica, FCEyN, UBA
mailto: sandoval@dna.uba.ar

La línea NMuMG (glándula mamaria murina normal) demostró una capacidad de migración incrementada comparada con células tumorales, y viabilidad luego de la exposición a doxorubicina (dox, Gador) por 96 hs o a un suplemento de SFB del 3%. Basados en estas observaciones, evaluamos el efecto del tratamiento por 48 horas con dox, sobre la proliferación y el metabolismo celular de NMuMG, las líneas murinas LM3 (carcinoma mamario) y 3T3-L1 (preadipocitos normales). Controles: células sin tratamiento. La quimiosensibilidad fue evaluada por incorporación de 3H-timidina (3H-t) y ensayo MTT (bromuro de tetrazolio). El metabolismo celular no fue significativamente afectado (ns) por dox (MTT=Ci50 para 3T3-L1: 500 ± 3,6 ng/ml; NMuMG: 250 ± 10,3 ng/ml; LM3: Ci50 no alcanzada, dosis 2000 ng/ml). Contrariamente, el efecto fue marcado en la proliferación (3H-t=Ci50 para LM3: 30 ± 3,6 ng/ml; 3T3-L1: 50 ± 6,3 ng/ml; ns-ANOVA-Tukey). NMuMG mostró dos respuestas: toxicidad a bajas dosis y resistencia a altas. Esta diferencia se correlacionó con el grado de confluencia de las células: Ci50 para NMuMG subconfluentes: 100 ± 5 ng/ml, postconfluentes: 730 ± 7 ng/ml (p<0,001 entre sí y comparada con LM3 y 3T3-L1). Fenómenos dependientes de confluencia alterarían la respuesta de las células NMuMG a la dox, confiriéndoles ventajas de sobrevivencia y resistencia a su acción antiproliferativa.

205. Nivel de Oxido Nítrico (NO) inducido por Lipopolisacárido (LPS) y regeneración hepática. Teresa Ronco(1), María de Luján Álvarez(1), María C. Carrillo(1), Juan A. Monti(1), Cristina Lugano(2), Gerardo Pisani(2), Cristina E. Carnovale(1).

(1)Instituto de Fisiología Experimental (CONICET) - Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR (2)Cátedra de Morfología. Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR
mailto: tereronco@hotmail.com

En estudios previos demostramos que la inhibición de NOS2 no produce el aumento de NO a las 5 horas post-hepatectomía, existiendo disminución de LPO y del índice de regeneración. Objetivo: Analizar la influencia del aumento de NO producido por inducción de NOS2 con LPS en el proceso de regeneración. Métodos: Ratas Wistar machos adultos fueron divididas en 3 grupos (n=5): Control, LPS 2 mg / kg PC i.p. (LPS1) y LPS 4 mg / kg PC i.p. (LPS2). Cada grupo se subdividió en 2: Sham (Sh) y hepatectomizadas 65% (Hp). Las ratas fueron sacrificadas a las 5 y 24 horas luego de la cirugía. Resultados: El nivel de la enzima NOS2, mostró un aumento del 24% en los grupos Hp tratados respecto de la Hp Control. Se observó un aumento significativo de NO medido como contenido de nitratos citosólico (nmol de nitrato/mg de proteína): Hp-Control 5h: 8,90±1,2; Hp-LPS1 5h: 16,1±1,9* Hp-LPS2 5h: 12,3±0,7* (*p<0,05). El nivel de lipoperoxidación se determinó como nmoles de malondialdehído/100mg proteína microsomal (Hp-Control 5h: 112±7; Hp-LPS1 5h: 144±6*; Hp-LPS2 5h: 139±5*). El índice de regeneración estimado como incorporación de [3H]-timidina al ADN (dpm/mg ADN) en

las ratas pretratadas con LPS1 y LPS2 no mostró modificaciones en el pico observado normalmente a las 24h después de una HP (HP-24h-C: 41250±3100). Conclusión: La inducción de NOS2 por LPS es independiente de las dosis estudiadas. El aumento temprano de NO y LPO no producen modificaciones en el proceso de regeneración hepática.

206. Modulación de la proliferación de hepatocitos porcinos cultivados in vitro sin matrices exógenas. Mariana R. Barbich(1), Alicia S. Lorenti(1), Vanina Morales(1), Gabriela Barrientos(1), Silvia Racedo(1), Alejandra Hidalgo(1), Florencia Callero(1), Pablo Argibay(1).

(1)Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental-Hospital Italiano de Buenos Aires
mabar@hitalba.edu.ar

Células provenientes de hígados porcinos podrían ser utilizadas como el componente biológico de un hígado bioartificial. Para ello es necesario estudiar los parámetros que permitan obtener el mayor número de células viables y funcionales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad proliferativa de hepatocitos porcinos adultos cultivados en ausencia de matrices exógenas, en medios con diferente composición de factores de crecimiento y suero fetal bovino (SFB). Las células fueron cultivadas durante 30 días. El pico proliferativo, determinado a través de la incorporación de ³H timidina, se observó en todos los casos el día 10, obteniéndose el valor máximo (8653.94 +/- 2048cpm) al usar 1% de SFB y medio completo (insulina, EGF, BPE, hidrocortisona y transferrina). En iguales condiciones, pero en presencia de 10% de SFB el valor cayó a 2484.07 +/- 1396.06 cpm. En ausencia de hidrocortisona la capacidad proliferativa se mantuvo por un período mayor (20 días). En ausencia de insulina o EGF, las células sólo permanecen pegadas al sustrato de cultivo durante 15 días, independientemente del agregado de los otros factores de crecimiento. Podemos concluir que la composición de factores de crecimiento tiene un efecto modulador sobre la capacidad proliferativa y la adherencia de las células a largo plazo. Particularmente, la presencia de SFB tiene efecto inhibitorio sobre la capacidad proliferativa de los hepatocitos porcinos.

207. Oxido nítrico mitocondrial, estado redox y desarrollo hepático. Daniela Converso(1), Sabrina Skverer(1), Damián Levismán(1), María C. Carreras(1), Juan J. Poderoso(1).

(1)Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires
mailto: daniela_converso@yahoo.com.ar

El óxido nítrico (NO) producido por la NO sintasa mitocondrial (mtNOS) regula el consumo y la producción de especies activas del oxígeno. Considerando que estas especies participan en la regulación del ciclo celular, el objetivo propuesto fue comparar la actividad de mtNOS (3H-L-citrulina), de Mn-SOD (espectrofotometría) y la velocidad de producción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂, fluorometría) de mitocondrias aisladas de hígado de ratas adultas (A) y recién nacidas (P2-4). Los resultados demuestran que la actividad de mtNOS está disminuida en las ratas neonatas respecto de las adultas (A: 29±2 vs P2-4: 19±2 pmoles/min.mg prot., p<0.05), al igual que la producción máxima de H₂O₂ estimulada por antimicina (A: 0.13±0.02 vs P2-4: 0.11±0.02 nmoles/min.mg prot., n.s.). La producción de H₂O₂ dependiente de NO (en presencia de L-Arg 100 μM vs L-Arg + 1mM L-NMMA), fue mayor en las adultas (A: 0.10±0.01 vs P2-4: 0.06±0.01 nmoles/min.mg.prot, p<0.05), con un cociente H₂O₂ (NO-dependiente): H₂O₂ (máxima) de A: 0.77 vs P2-4: 0.55, en concordancia con las respectivas actividades de mtNOS. La actividad de MnSOD también se encontró disminuida en las ratas neonatas (A: 1.42±0.11 vs P2-4: 0.83±0.12 nmoles/mg.prot, p<0.05). Los datos sugieren que en esta etapa del desarrollo hepático, las actividades de mtNOS y MnSOD controlan la concentración citosólica de H₂O₂, contribuyendo a la regulación redox-dependiente del ciclo celular.

REPRODUCCIÓN II

- 208. Distribución de eosinófilos y macrófagos en el cérvix uterino de la rata durante el ciclo estral, la preñez y el posparto.** Jorge G. Ramos(1), Jorgelina Varayoud(1), Verónica Bosquiazzo(1), Milena Durando(2), Mónica Muñoz de Toro(1), Enrique H. Luque(1).

(1)Lab. de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes. Fac.de Bioquímica y Cs. Biológicas.UNL (2)Lab. de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes.Fac.de Bioquímica y Cs. Biológicas.UNL
 eluque@fbc.unl.edu.ar

El cérvix uterino sufre cambios histofisiológicos relacionados con una mejor aptitud reproductiva. Nuestro objetivo fue estudiar la infiltración de macrófagos (mac) y eosinófilos (eos) en el cérvix uterino de la rata durante el ciclo estral, preñez y posparto. Se tomaron muestras de cérvix en diestro II (DII), estro (E), durante la preñez [entre los días 5 (D5) y D23] y el posparto (PPD). Se identificaron los eos con la tinción histoquímica de Sirius rojo y los mac por inmunohistoquímica. Los resultados se expresaron como densidad de volumen (Vv x 100) usando la metodología de Weibel. El Vv de eos en DII es menor que en E (DII: 1.26 ± 0.26 vs E: 1.64 ± 0.18 ; $p < 0.05$). Durante la preñez aumentan hacia el final (D9: 0.25 ± 0.13 vs D22: 0.37 ± 0.13 ; $p < 0.05$) y se acentúan el día del parto (D23: 1.27 ± 0.06 ; $p < 0.05$). En el posparto se observaron los mayores niveles de infiltración (PPD1: 2.04 ± 0.12). La infiltración de mac no mostró diferencias entre DII vs E. Se observó un incremento en los D20 y D21 de preñez (D9: 0.94 ± 0.29 vs D21: 2.85 ± 0.09 ; $p < 0.05$). En PPD1 el aumento significativo ocurre sólo en la región muscular. El incremento de eos y mac previos al parto y durante el posparto sugiere su posible participación como mediadores de la remodelación de la matriz extracelular asociada al proceso de dilatación del cérvix uterino y su recuperación posparto.

- 209. La mayor susceptibilidad al stress en las ratas hipoprolactinémicas IFL Nu contribuye a su déficit de lactancia.** Graciela A. Jahn(1), Ricardo P. Deis(1).

(1)Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU-CONICET, Mendoza.
 mailto: gjahn@lab.cricyt.edu.ar

Las ratas IFL Nu tienen lactancia disminuida causada por liberación reducida de PRL y ocitocina frente a la succión, pero responden exageradamente al stress, en liberación de PRL y GH. Dado que el stress es un conocido bloqueante del reflejo de succión investigamos si la elevada respuesta al stress de estas ratas podía ser un factor causal del déficit de lactancia. Ratas Wistar e IFL en los días 10-12 de lactancia fueron separadas 8 h (8 a 16 hs) de sus crías durante 3 días consecutivos, las crías fueron pesadas antes y 30 min, 2 y 4 hs después de reponer con las madres. A las 15.30 h del 2º día se las sometió a un stress de éter por 2 min (grupo stress). Se tomaron muestras de sangre durante la exposición al éter y 5 min. después (valores basal y stress) o 30 min. luego de reponer las crías (respuesta a la succión aguda). Se midió PRL, GH y ocitocina por RIA. El stress por éter disminuyó significativamente el aumento de peso de las crías (IFL: Co 0.50 ± 0.09 ; stress 0.07 ± 0.07 g/cría) y la secreción de PRL (IFL: Co 248 ± 31 ; stress 96 ± 16 ng/ml) durante la succión en las ratas IFL Nu pero no en las Wistar (aumento de peso Co 1.06 ± 0.13 ; stress 0.91 ± 0.11 g/cría; PRL Co 434 ± 40 ; stress 351 ± 29 ng/ml). Las ratas IFL Nu también liberaron más PRL 5 min. luego del stress (IFL 24 ± 4 ; Wistar 9 ± 1 ng/ml), demostrando que su respuesta exagerada al stress es capaz de interferir con el reflejo de succión y por ende ser parcialmente responsable del déficit de la lactancia.

- 210. Apoptosis y proliferación de las células del túbulo seminífero en el testículo prepuberal humano.** Mariela I.

Sciara(1), Esperanza B. Berensztein(1), Virginia L. Lencinas(1), Marco A. Rivarola(1), Alicia Belgorosky(1).

(1)Lab. de Investigación. Hospital de Pediatría Garrahan marielasciara@hotmail.com

El testículo humano sufre un período de activación postnatal. El objetivo fue estudiar el número de células del túbulo seminífero (de Sertoli, CS y germinales, CG) en apoptosis y en proliferación durante la prepubertad. Se definieron el Grupo1(G1), período neonatal, 1 a 21 días de vida; G2, período de activación postnatal, 1 a 6 meses de edad y G3, período de quiescencia, 12 a 120 meses de edad. Se estudiaron testículos de necropsias de 46 sujetos sin patología endocrina. La apoptosis fue estudiada con el método (DeadEndTM, Promega) y la proliferación por inmunohistoquímica con el anticuerpo Ki-67 (DAKO). El índice Apoptótico (IA) y el índice de Proliferación (IP) fue definido como el número de células positivas por cien totales. El IA de CS en G1 (6.6 ± 4.07) fue significativamente menor que en G2 (22 ± 14) y que en G3 (24 ± 18.7), $X \pm DS$ $p < 0.05$. El IA de las CG en G1 (15 ± 6.6) también fue significativamente menor que en G2 (27 ± 8.8) y que en G3 (29.5 ± 10.2), $X \pm DS$ $p < 0.05$. El IP de CS no fue diferente entre los distintos grupos. El IP de CG en G1 (18.6 ± 13.0) fue significativamente mayor que en G2 (10.0 ± 6.5) y en G3 (11.2 ± 6.9), $X \pm DS$ $p < 0.05$. Estos resultados muestran que el período neonatal previo a la activación postnatal testicular representa un período crítico definir la masa de células disponibles para la maduración sexual.

- 211. Establecimiento espacio-temporal del daño espermatogénico murino inducido por el consumo semicrónico de alcohol.** Cristian M.A. Sobarzo(1), Eduardo Bustos-Obregón(2), Elisa Cebal(3).

(1)Departamento de Ciencias Biológicas y Químicas. Facultad de Ciencias. Universidad Católica de Temuco (2)Laboratorio de Biología de la Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. (3)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos-CONICET
 mailto: crsob@uctem.cl

La ingesta crónica de etanol es deletérea para la función testicular y espermatogénica. Se evaluó el efecto de la exposición semicrónica de etanol sobre la espermatogénesis, la morfología y la función espermatogénica. Ratones machos adultos se intoxicaron por 15 días con 15% de etanol en el agua de bebida (T). Los controles recibieron agua (C1) o bebida isocalórica con el etanol (C2). Se realizó histología testicular, recuento espermatogénico, análisis de la morfología, la viabilidad, la capacitación (motilidad e hiperactivación) y la reacción acrosomal (test de HOS-Spermac). El aumento significativo en el diámetro tubular y la altura del epitelio seminífero (T: 221.1 ± 2.1 , C: 216.4 ± 1.5 ; 65.8 ± 1 vs. 62.2 ± 0.5) se acompañó de incremento de las espermatogonias (A, In, B) en los T respecto de los C1 y C2 ($p < 0.05$) mientras que se redujeron las células a partir de los estados meióticos (PL, L, Z, P) y las espermatidas redondas ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Junto con el incremento de alteraciones de cabeza y flagelo (T: 10.5 ± 1.5 , C: 6.6 ± 9 ; 16.8 ± 2 vs. 8.9 ± 0.8), se observó disminución de la hiperactivación (14 ± 2.5 vs. 23.7 ± 2.5) y de la reacción acrosomal (17.8 ± 3.3 vs. 33 ± 6.7) a los 120 minutos de capacitación. Estos resultados sugieren que el etanol inhibe parcialmente la entrada en meiosis de las espermatogonias lo cual produciría oligo-astenozoospermia a largo plazo. A nivel epididimario, induce anomalías espermatogénicas y afecta eventos de la capacidad fecundante. Se discuten los mecanismos implicados.

- 212. Efecto de endotelina-1 sobre los niveles de óxido nítrico y de PGE2 en placenta de rata sana y diabética a término.** Evangelina Capobianco(1), Alicia Jawerbaum(1), Carolina Pustovrh(1), Verónica White(1), Débora Sinner(1), Elida Gonzalez(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos
 mailto: ebianco@uole.com

Las endotelinas (ETs) son potentes agentes vasoconstrictores que modulan el flujo sanguíneo uteroplacentario y la transferencia de nutrientes al feto. Se estudia la capacidad de ET1 de modular los niveles de óxido nítrico (NO) y de PGE2 en tejido placentario de ratas sanas (C) y diabéticas (D) obtenidas por administración neonatal de estreptozotocina (100 mg/kg), en el día correspondiente al parto. El tejido placentario se incubó durante 3 hs, para luego dosar los niveles de nitratos y nitritos según reacción colorimétrica de Griess, y la producción de PGE2 por RIA. Se observa una disminución en los niveles de nitratos/nitritos (nmol/mg) al adicionar ET1 10⁻⁷ M al medio de incubación tanto en placenta control (C: 4±0.2, C+ET1: 2.6±0.2 p<0.001) como diabética (D: 4.6±0.5, D+ET1: 2.8±0.4 p<0.02). En placenta C, observamos que la producción de PGE2 (pg/mg) disminuye en presencia de ET1 10⁻⁷ M (C: 107±11, C+ET1: 49±12 p<0.01), mientras que no se observa esta acción en el tejido diabético (D: 112±12, D+ ET1: 132±13). Se concluye que ET1 es capaz de inhibir la producción de NO y de PGE2 en tejido placentario C, observándose en placenta D inhibición de la generación de NO pero no de la producción de PGE2, probable causa de alteraciones en el flujo de nutrientes y oxígeno hacia el feto.

213. Niveles de Endotelina-1 en el embrión de rata diabética tipo II. Relación con la generación de Oxido Nítrico. Débora Sinner(1), Alicia Jaberbaum(1), Carolina Pustovrh(1), Verónica White(1), Evangelina Capobianco(1), Elida Gonzalez(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET)
mailto:deboras@sinectis.com.ar

Las endotelinas (ET1) y el óxido nítrico (NO), agentes vasoactivos, median la formación del tubo neural y estructuras derivadas de células de cresta neural durante la organogénesis. Objetivos: evaluar niveles de ET1 y NO en embriones control (EC) y de ratas diabéticas tipo II (ED) (por administración neonatal de estreptozotocina 100mg/kg), determinando intermodulaciones entre ambos agentes. ED y EC fueron incubados durante una hora en presencia de spermin NONOate (SP, dador de NO); NMMA (inhibidor de NO sintasa); ET-1 o Bosentan (BO), antagonista del receptor de ET-1. Finalizada la incubación se determinan los niveles de nitratos/nitritos (Nit) por reacción de Griess (nmol/mg prot), o de ET-1 (Elisa, pg/mg prot). ED presentan niveles incrementados de ET1 (60±9 vs 32±5, p<0.02) y de Nit (73±7 vs 27±4, p<0.001). La adición de SP incrementó los niveles de ET-1 (EC54±8vs C; ED:90±1vs D, p<0.05), mientras que disminuyen con NMMA, (EC:18±2 vs C; ED: 36±2 vs D, p <0.05). La adición de ET1, disminuyó los niveles de Nit (EC 13.8±2 vs C; ED 42±2 vs D; p<0.02), mientras que BO incrementó dichos niveles (EC:39±2 vsC; ED 103±8 vs D,p<0.05). Concluimos que los niveles de ET1 y de NO se encuentran incrementados en ED; NO modula positivamente los niveles de ET1; por su parte ET1 modula en forma negativa los niveles de NO. Esta intermodulación sería beneficiosa para evitar la producción de agentes capaces de generar daño al embrión en desarrollo.

214. Estudio de la apoptosis de las células germinales en un cuadro de orquitis autoinmune experimental (OAE): detección de Fas y del receptor de TNF-alfa tipo 1 (TNFR1). Susana Theas(1), Claudia Rival(1), Livia Lustig(1).

(1)Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. UBA.

Las células germinales constituyen el blanco del ataque inmunológico en la OAE. Previamente demostramos que espermatoцитos y espermátides sufren apoptosis previa a la descamación del tubo seminífero, fenómeno que se acompaña de aumento en la expresión de Fas y Fas L. En este trabajo, por técnicas simultáneas de TUNEL e inmunomarcación (Fas), detectamos la expresión de Fas en el 49.00±16.00% y el 43.50±6.36% de las células germinales apoptóticas de ratas con OAE sacrificadas a los 50 y 80 días, respectivamente. A efectos de determi-

nar la presencia de otros mediadores involucrados en la apoptosis de las células germinales y habiendo previamente determinado un aumento de TNF-alfa en el fluido testicular de ratas con OAE, estudiamos por inmunohistoquímica en cortes de testículo, la expresión de TNFR1. Observamos que el número de células germinales TNFR1 positivas aumenta significativamente en el grupo experimental (E) durante el desarrollo de la OAE respecto de los controles (C); 35d: C:7.16±2.56 vs E:6.67±1.63; 50-60d: C:3.83±2.93 vs E:6.67±6.23; 70-110d: C:2.17±2.40 vs E:37.16±9.19**; >110d: C:9.00±9.25 vs E: 85.22±41.64** (**p<0.01). Por técnicas de doble marcación observamos expresión de TNFR1 en células germinales apoptóticas en ratas con OAE. Estos resultados sugieren que los sistemas Fas/Fas L y TNF-alfa/TNFR1 están involucrados en la apoptosis que sufren las células germinales durante el desarrollo de una OAE.

215. La temperatura abdominal induce muerte celular por apoptosis en la cauda del epidídimo de ratón. Marco A. Jara(1), Pedro Esponda(1), Rosa Carballada(1).

(1)Centro de Investigaciones Biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
mailto:mjara@cib.csic.es

La temperatura (tº) regula la secreción de proteínas, la expresión de genes y la funcionalidad de la cauda (cd) del epidídimo. En mamíferos escrotados la cd está a 5-7ºC menos que los órganos intraabdominales. Así pues el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la tº abdominal en la inducción de apoptosis (Ap) en las células epiteliales de la cd. Para ello, ratones adultos fueron operados y se les colocó una cd en el abdomen (criptoepidídimo). Como control se analizó la cd contralateral (escrotal). Los animales se sacrificaron a las 12, 24, 48 hrs. y 20 días post-cirugía. El análisis histológico mostró células con signos morfológicos de Ap, que se confirmaron en estudios ultraestructurales. El % de túbulos positivos para Ap fue 20,9 ± 1,4 y 35,1 ± 3,0 (X ± ES) y el Nº de células apoptóticas por 100 túbulos de epidídimo fue 32,5 ± 3,0 y 64,9 ± 10,6 para 12 y 24 hrs, respectivamente. A las 48 hrs y 20 días los valores no fueron diferentes de los controles. Las células apoptóticas fueron positivas al utilizar la técnica de TUNEL y el ADN mostró un patrón de escalera (ladder). Por otra parte, se evaluó el papel que cumplían el receptor de andrógenos, la proteína p53 y proteínas de choque térmico (hsp25 y hsp70), no observándose diferencias entre la cd criptica y la cd escrotal. En conclusión, los resultados indicaron que la tº abdominal inducía Ap en la cauda del ratón y que este efecto era independiente del receptor de andrógenos y de las proteínas hsp25, hsp70 y p53.

216. Apoptosis incompleta sin participación de lisosomas en espermátidas inmaduras (EI) y células multinucleadas (CM) producida por ligadura de conductos eferentes (LCE) en ratas. Elsa Anton(1).

(1)Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.
mailto:

LCE produce daño de EI y células de Sertoli (CS) y aparición de CM. Se investigó el rol de lisosomas en ese daño. Se hizo LCE unilateral a ratas Wistar, se sacrificaron a 1,2,3,5,7,10 ds y los testículos (T) perfundidos con Bouin para micr. óptica (MO) con tricrómico que tiñe rojo núcleos y gránulos apoptóticos (GA) y 5 % glutaraldehído para micr. electrónica (ME) de fosfatasa ácida (FA). Controles: T contralateral y normales. La MO mostró vacuolización de CS, EI con anular o completa condensación de cromatina verde o roja. La aparición de CM mostró tubos con 1 o más: Normal: 0%; 2 ds: 8,2%; 5 ds: 48%; 7 ds: 65%; la morfología nuclear fue similar en EI y CM. CM muy teñidas de rojo siempre fueron más pequeñas. Nunca se vieron GA. ME: en controles hay FA en Golgi de CS, gonias, citos y EI y en lisosomas de CS, cuerpos residuales y pocos en células germinales. En LCE la marginación de cromatina en EI fue rápida sin formar GA a pesar de separarse las membranas nucleares y tampoco en CM con

cromatina anular, con organoides conservados y vacuolas autofágicas sin FA. En CM de cromatina totalmente condensada y citoplasma con vacuolas fue imposible identificar organoides. Citoplasma de CS sin lisosomas rodeando las células anómalas descartó la heterofagia y la falta de lisosomas en EI y CM autofagia. Conclusión: LCE produce EI y CM con aspecto nuclear de apoptosis sin GA, por probable defecto de formación y/o falla de las CS en reconocer, captar y degradar células patológicas.

INMUNOLOGÍA V

217. Actividad anti-hGM-CSF en inmunoglobulinas humanas de uso farmacéutico. Marcos R. Oggero Eberhardt(1), Ricardo B. Kratje(1), Marina Etcheverrigaray(1).

(1) *Laboratorio de Cultivos Celulares. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL*

Se identificó la presencia de anticuerpos anti-rhGM-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos humano recombinante) en un pool de sueros de individuos normales destinado a la obtención de preparaciones farmacéuticas de inmunoglobulinas humanas. Estos anticuerpos neutralizaron parcialmente la interacción entre el receptor de hGM-CSF presente en células TF-1 y la citoquina radiomodificada. Ensayos de competición en fase sólida entre dichos anticuerpos y un panel de anticuerpos monoclonales anti-rhGM-CSF caracterizados previamente, permitieron establecer que los epitopes A18E21R23R24F119, R23E21N17W13, P118F119W13E14 y L61YKQGKLRGSLTK72 son reconocidos por las inmunoglobulinas humanas, confirmando su capacidad neutralizante de la actividad biológica de la citoquina. Estudios de inhibición competitiva demostraron que los anticuerpos humanos interaccionan no sólo con la citoquina producida en bacterias sino también con su versión glicosilada, obtenida a partir de cultivos de células de mamífero. De esta manera, la presencia de estos anticuerpos podría ser responsable de la inhibición del hGM-CSF endógeno afectando la terapia con anticuerpos naturales.

218. A Longitudinal Study in Common Variable Immunodeficiency (CVID) at adults. Diego S. Fernández Romero(1), Graciela R. Bierfass(1), Neri A. Nuñez(1), María V. Paolini(1), Belen Rodríguez Cardozo(1), Ana M. Di Lonardo(1).

(1) *Unidad Inmunología Hospital Dr. Carlos G. Durand*

This study is a series of 9 CVID adult patients (F1/M8), mean age 32,2 years, with a mean follow up of 7,8 years. Beginning of symptoms was at a mean age of 16 years (20-40) with a mean level of Ig G of 167,6 mg%(12-390), and IgA and IgM deficiency and an altered immunopheno-type. Before diagnosis 8 patients had upper airway infections (UAI), 8 lower airway infections, 4 diarrhea, 1 pielonephritis, 1 skin infections, 2 hepatitis. Two patients had autoimmune disease: ulcerative colitis(1) vitiligo(1). Another one had asthma. Mean age of diagnosis was 25 years(13-45). Concluding, in this series the time between beginning of symptoms and diagnosis was extremely long (mean 10 years 2-16). Substitutive therapy with IVIG resolved severe infections in all patients, persisting in six of them UAI, spite of levels of Ig G >400mg%.

219. Estudio retrospectivo de 24 pacientes embarazadas con diagnóstico de Síndrome Antifosfolipídico (APS). José Latino(1), Graciela R. Bierfass(2), María V. Paolini(2), Carmen F. Lessa(2), Diego S. Fernández Romero(2), Orlando G. Carballo(2), Mario Pesaresi(1), Ana M. Di Lonardo(2).

(1) *División Obstetricia y Tocoginecología Hospital Dr. Carlos G. Durand, Bs. As. Argentina.* (2) *Unidad Inmunología Hospital Dr. Carlos G. Durand, Bs. As. Argentina.*

Nuestro propósito fue determinar la evolución del embarazo y los resultados perinatales en una serie de pacientes con diagnóstico de APS primario y secundario. Se realizó un estudio retrospectivo de una serie de 188 pacientes (1988 a 2001) con diagnóstico de diferentes enfermedades autoinmunes. Del total estudiado el 49%(N=92) reunía 4 o más criterios de clasificación de la ACR para SLE y un 12%(N=24) con diagnóstico de APS de acuerdo a los criterios establecidos por la convención de Sapporo, 1998(Japón). Un 58%(N=14) presentaban APS primario y un 42%(N=10) APS secundario. 8 SLE, 1 Artritis Reumatoidea y 1 Esclerodermia conformaban el grupo de APS secundario. El seguimiento constó de un control obstétrico, laboratorios general e inmunológico. Los tratamientos recibidos fueron: Aspirina a bajas dosis, heparina, corticoides vía oral a dosis variables y gamaglobulina de molécula entera endovenosa en diferentes combinaciones. En la serie presentada se obtuvo un 58% de éxito, refiriéndose como tal al porcentaje de nacidos vivos sobre el total de embarazos. La falla del embarazo, sin especificar la edad gestacional, ocurrió en un 42% de los pacientes lo cual concuerda con las cifras reportadas en la bibliografía mundial. Las complicaciones más frecuentes fueron Ruptura Prematura de Membranas y el Retardo en el Crecimiento Intrauterino. En la serie presentada el pronóstico de los embarazos no parece estar relacionado con la mayor o menor agresividad de la terapéutica.

220. A study of systemic lupus erithematosus (SLE) male patients. María V. Paolini(1), Orlando G. Carballo(1), Diego S. Fernández Romero(1), Pablo Mannuchi(1), Sivia G. Ramos(1), Ana M. Di Lonardo(1).

(1) *Unidad Inmunología. Htal. C.G. Durand. Bs As. Argentina.*

Fourteen SLE male patients(pts) were followed up for a mean period of 45 months (5-51), with a beginning of disease mean age of 26 years (13-50). The main affected systems were: musculoskeletal 57% 8pts, mucocutaneous 72% 10 pts: malar rash (MR) 3 pts, photosensitivity(P) 1pts, discoid lesions 1pts, MR and P 3 pts, MR and oral ulcers(OU) 1pts, MR-P-UO 1pts, serositis 36% 6pts, pleural effusion 4 pts and pericardial effusion 2 pts; hematologic: 21%; thrombocytopenia 1 pts and lymphopenia 2 pts; renal 36% 5pts: glomerulonephritis(GN) Class IV(OMS) 3 pts, GN Class V 1 pts, GN Class II 1 pts; nervous system: 1pts. All patients had ANA(+), 4 had anti-DNA (-), 3 had anti-DNA (+), 5 become anti DNA(-), 1 becomes anti-DNA(+). Six pts showed normal C3 and C4, 8 hypocomplementemia. Beginning of disease was at an early age in most of patients. 5 pts (36%) had severe SLE (renal and nervous system commitment). The most frequent manifestation in this series was the mucocutaneous one.

221. Determinación de anticuerpos anti-queratina (AKA) y factor anti-perinuclear (APF) en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Mariel A. Abovich(1), Orlando G. Carballo(1), Carmen F. Lessa(1), Ana M. Di Lonardo(1).

(1) *Unidad Inmunología, Hospital General de Agudos «Dr. Carlos G. Durand»*

Introducción: Los AKA y APF son marcadores de artritis reumatoidea(AR). Usando inmunofluorescencia indirecta(IFI) los AKA marcan el estrato corneo de epitelio cornificado, y el APF, los gránulos de queratohialina de las células del epitelio de la mucosa bucal humana. Objetivo: investigar la presencia de AKA y APF en pacientes con diagnóstico de LES. Materiales y métodos: La presencia de APF y de AKA fue investigada en 20 normales y en 47 pacientes con LES, diagnosticados según los criterios del Colegio Americano de Reumatología. La edad promedio fue de 33,8 años (17 a 60 años) y el tiempo de evolución promedio fue de 8,3 años (0,25 a 21 años). Ambos anticuerpos fueron estudiados por IFI usando células de mucosa bucal humana como sustrato para APF y los cortes criostáticos de tercio medio de esófago de rata para AKA. Resultados: De los 47 sueros estudiados, 4 (8,5%) fueron positivos para AKA y uno de ellos fue también positivo para APF. En todos los casos positivos el título

fue bajo para ambos marcadores (AKA = $0 < 1/20$ y $APF=1/5$).
 Discusión: Los AKA y el APF han probado ser buenos marcadores para la AR. Sin embargo pueden ser detectados en bajos títulos en otras enfermedades autoinmunes como la tiroiditis, LES y esclerosis sistémica. Nuestros resultados coinciden con lo descrito en la literatura, ya que en este estudio sólo se hallaron resultados positivos en bajo título para AKA y APF en una pequeña proporción de pacientes con LES.

222. Anticuerpos anti-transglutaminasa tisular en el diagnóstico y monitoreo de pacientes con Enfermedad Celíaca.

Fernanda Ingenito(1), Silvia G. Ramos(1), Ana M. Di Lonardo(1).

(1)Unidad Inmunología. Hospital C.G. Durand. Buenos Aires. Argentina.

mailto: sgramos@infovia.com.ar

El objetivo de este estudio fue evaluar la sensibilidad y especificidad de un EIA comercial para la determinación de At-TG comparando con anticuerpos anti-gliadina (AGA) y anti-endomisio (EMA) en suero de pacientes celíacos no tratados y tratados con dieta libre de gluten (GFD). Estudiamos suero por EIA para AGA-IgA e IgG, EMA-IgA por IFI con dilución inicial 1:5 utilizando como sustrato esófago de mono y At-TG-IgA por EIA en 30 pacientes adultos con Enfermedad Celíaca (CD): 21 no tratados y 9 tratados con GFD estricta por 3 a 12 meses y 30 controles normales. Todos los pacientes con CD cumplían los criterios diagnósticos ESPGA (European Society for Paediatric Gastroenterology). La sensibilidad y especificidad fue 100 % y 100 % respectivamente para EMA-IgA, 100 % y 93 % para At-TG, 90 % y 97 % para AGA-IgA y 86 % y 87 % para AGA-IgG. En los 9 Pacientes con GFD se observaron 4 sueros EMA positivos (3 en dilución 1:5 y 1 en 1:10), mientras 6 sueros fueron reactivos para At-TG. AGA-IgG e IgA fueron positivos en 2 y 3 sueros, respectivamente. Estos resultados demuestran que At-TG es un excelente método para la identificación de pacientes con CD; mostrando mayor sensibilidad que EMA y AGA en el monitoreo de la adhesión de los pacientes a la GFD, sugiriendo que At-TG puede utilizarse como un método alternativo para un adecuado screening y monitoreo de pacientes con CD.

223. Polyclonal free light chains (pflc) of immunoglobulin in urine of patients with SLE. Belen Rodriguez Cardozo(1), Fernanda Ingenito(1), Silvia G. Ramos(1), Ana M. Di Lonardo(1).

(1)Unidad Inmunología. Hospital C.G. Durand. Buenos Aires. Argentina.

mailto: sgramos@infovia.com.ar

Our aim was to determine if increases of PFLC in urine is a marker of in vivo B cell hyperactivity, as well as to correlate with Disease Activity Index (SLEDAI) in patients with SLE without nephropathy nor infections. We included 17 patients (15F/2M, 37 ± 15 years) that fulfilled Revised Criteria of ACR for SLE. The overall disease activity was scored using the SLEDAI. We separated all patients in group 1: SLEDAI<4, and 2: SLEDAI>4. 24-hour urine specimens were analyzed by double immunodiffusion (ID), with antisera specific for 'free' light chains. The sensitivity of method is 30 mg/l. Light chains may be polyclonal and/or monoclonal and were identified by immunofixation (IFE) using concentrated up to 100-fold by ultrafiltration before IFE. The SLEDAI score ranged from 0 to 17. In SLE patients with SLEDAI > 4 (group 2) urinary PFLC were positive in 8/9 (89%), $p < 0.001$; and in those with SLEDAI < 4 (group 1) in 3/8 (37%), $p < 0.01$ compared with 30 healthy controls, all negatives. Positive results was also significantly higher in patients of group 2 vs. Group 1, $p < 0.01$. The presence of PFLC in urine shown correlation with SLEDAI ($r = 0.50$, $p < 0.01$). This results was suggesting a higher state of immune activation in group 2. In this patients PFLC could be a marker of in vivo B cell hyperactivity. The significance of these observations needs further evaluation in a longitudinal study to validate if PFLC might act as a predictive marker of disease flares and SLE nephropathy.

224. Valores de referencia de sICAM-1 en pediatría. Héctor Quiroz(1), Jeanette Balbariski(1), Claudio Cantisano(1), Silvina Raiden(1), Eduardo Gaddi(1), Vera Giraudi(1).

(1)Hospital Elizalde Inmunología

La forma soluble de la molécula de adhesión intercelular 1,sICAM-1, presenta aumentos de distintas magnitud en patologías pediátricas, por lo cual resulta necesario establecer valores de referencia en dicha población. Se procesaron 89 muestras de niños clínicamente sanos, divididos en los siguientes intervalos etarios: 1) recién nacidos ($n=20$), 2) 1 - 12 meses ($n=15$), 3) 13 - 24 meses ($n=17$), 4) 2-5 años ($n=20$), 5) 6-12 años ($n=17$) y un grupo control de 25 adultos sanos. En la determinación de s-ICAM-1 se utilizó un kit comercial (R&D Systems), según especificaciones. Los niveles sICAM-1 en los distintos grupos fueron: 1) 278 ± 53 ng/ml, 2) 574 ± 135 ng/ml, 3) 498 ± 101 ng/ml, 4) 439 ± 131 ng/ml, 5) 347 ± 114 ng/ml, grupo control 240 ± 95 ng/ml. No hubo diferencias significativas entre los valores de los recién nacidos y los adultos sanos, pero se observó un marcado incremento de los niveles en el primer año de vida, y diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo 2) y los grupos 1) 4) 5) y control. La mayor activación inmune durante el primer año de vida sería responsable del aumento en los niveles de sICAM-1. La progresiva disminución en los valores de esta molécula luego de los 12 meses en los distintos grupos etarios, hasta alcanzar los valores de adultos, reflejaría la progresiva madurez funcional del sistema inmune.

225. Valores secuenciales de sL-selectina en niños HIV(+).

Eduardo Gaddi(1), Graciela Barboni(1), Marcela Candi(1), Claudio Cantisano(1), Jeanette Balbariski(1), Vera Giraudi(1).

(1)Hospital Elizalde Inmunología

L-selectina es una glicoproteína de la superficie leucocitaria cuya forma soluble, sL-selectina, es considerada un marcador temprano y sensible de activación inmune. 12 niños HIV + con distinto compromiso inmune fueron seleccionados para evaluar el comportamiento secuencial de sL-selectina a lo largo de un año. A los mismos se les practicaron estudios clínicos de rutina y determinaciones seriadas de LTCD4 (FACScan, Becton Dickinson), carga viral plasmática (Nuclisens Organon) y sL-selectina (R & D Systems). Al finalizar el período de seguimiento la evaluación en base al estado clínico y los controles de laboratorio permitió establecer tres grupos de 4 niños cada uno con distintas características: grupo 1) niños con compromiso clínico- inmunológico severo, en los cuales el valor medio de los niveles de sL-selectina fue 3151 ± 408 ng/ml; grupo 2) pacientes medianamente comprometidos, en los que se comprobó una mejoría tanto clínica como en los niveles de LTCD4, en ellos, el valor de sL-selectina fue 2291 ± 657 ng/ml; grupo 3) pacientes estables, con niveles de sL-selectina 1642 ± 344 ng/ml. Los niveles de sL-selectina constantemente elevados encontrados en el grupo 1) podrían ser debidos a la mayor activación inmune inducida por el HIV. La tendencia a la normalidad en los valores de los pacientes de los grupos 2) y 3) respondería a la diferente capacidad de respuesta del sistema inmune, características virales y de la terapéutica implementada.

226. Desarrollo de vacunas genéticas contra el síndrome urémico hemolítico (SUH). Alejandra V.E. Capozzo(1), Graciela Dran(1), Virginia Pistone Creydt(2), Macarena Beigier Bompadre(1), Martín A. Isturiz(1), Marina S. Palermo(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas. A. Nacional de Medicina (2)Dto.Fisiología, Lab. Fisiopatogenia, Fac. de Medicina,UBA.
 alejavicca@yahoo.com.ar

La shiga-toxina (Stx2) producida por E.coliO:157H7 puede causar SUH en niños infectados, enfermedad para la que no hay

vacuna ni tratamiento específico. Esta toxina posee una subunidad A tóxica y una subunidad B pentamérica de unión a su receptor. En este trabajo se desarrolló un vector de expresión eucariota conteniendo el gen de la subunidad B: pB, para ser usado como vacuna. Células BHK transfectadas con pB expresan una proteína que forma pentámeros, reacciona con anticuerpos (Ac) anti subunidad B de Stx2 y se localiza en la membrana celular. Grupos de 5 ratones Balb/c, recién nacidos y adultos, fueron inyectados por vía i.m con una dosis de 10 ó 50 ug respectivamente, cada 15 días, de los siguientes plásmidos: pB, pB+pGM (el mismo vector con el gen del factor estimulador de colonias GM murino, utilizado como madurador de células presentadoras de antígenos), pGM o vector. Se encontraron Ac anti subunidad B por Western Blot en los recién nacidos inyectados con pB+pGM y en los adultos que reciben pB o pB+pGM, con títulos de ELISA promedio de 1/80 y 1/200, respectivamente. Sin embargo, los Ac inducidos no protegen frente a una dosis letal de Stx2 inoculada por vía e.v. Concluimos que la inyección de pB induce Ac específicos contra la Stx y la coinyección de pGM aumenta los niveles de Ac específicos tanto en neonatos como en adultos. Este es el primer intento de generar vacunas genéticas para el SUH, aunque aún debemos ajustar el tipo de respuesta para obtener Ac protectores.

227. Urticaria crónica (uc):evolución en 34 pacientes, prueba del suero autólogo, porcentaje de basófilos y activación in vitro de basófilos normales. Nora V. Galassi(1), Graciela Rey(2), Marta H. Felippo(1), Norma E. Riera(1), Alejandro Malbran(3).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas, ANM (2)Unidad de Alergia e Inmunología Clínica, CORIC (3)Unidad de Alergia e Inmunología Clínica, CORIC

La UC tiene distintas causas. Algunos pacientes (P) tienen autoanticuerpos dirigidos contra la IgE o hacia la cadena alfa del Fc receptor de alta afinidad y pueden demostrarse in vivo con la prueba de suero autólogo (PSA) o, in vitro, por su actividad biológica sobre el recuento de basófilos (Ba) circulantes o por la activación de Ba normales. Nuestro objetivo es correlacionar la PSA con las pruebas in vitro por citometría de flujo (CF). La PSA (inyección intradérmica de 0.1 ml de suero y registrada a los 30 y 120 min) se realizó en 34 P, 26 de sexo femenino, con edad media de 37 años (16-78). El recuento de Ba circulantes se realizó en 17 P por CF utilizando como marcadores anti-CD45 y anti-IgE de superficie. La activación de Ba normales con suero (dilución 1/2 45min. a 37°C) se estudió en 8 P por la inducción de la expresión de CD63. La PSA fue positiva en 23 P (68%). La evolución media de la UC fue de 623 días (107-3645), siendo de 702 días en P con PSA+ y 461 días para aquellos con PSA-. La media del porcentaje (X + 1DS) de los Ba en los controles normales fue igual a 0.52 + 0.26 (n=20), en los P fue 0.27% + 0.24 (n=17), p<0.003. Los cinco P con basofilia más intensa tuvieron PSA + y 2 indujeron activación de Ba en forma reproducible. En síntesis, todos los P con marcada basofilia tuvieron sin excepción PSA+ pero no todos aumentaron in vitro, la expresión de CD63 en Ba normales.

228. Rol de la trombomodulina (tm) en el síndrome urémico hemolítico (suh). Gabriela C. Fernández(1), Maroeska W.M. TeLoo(2), Thea J.A. Van der Velden(2), Lambert P.W. Van der Heuvel(2), Marina S. Palermo(1), Leo L.A. Monnens(2).

(1)Inmunología, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina (2)Pediatría, University Medical Centre st. Radboud, Nijmegen, The Netherlands
mailto: gabiferan@infovia.com.ar

La anemia hemolítica, trombocitopenia y el daño renal agudo caracterizan al SUH. Es causado por E.coli productoras de Shiga toxin (Stx). La Stx afecta las células endoteliales (CE) del glomérulo renal, e inhibe la síntesis de proteínas. La TM es una glicoproteína de membrana con actividad anticoagulante presen-

te en CE. Por otra parte, los neutrófilos (PMN) pueden unir la Stx e inducir daño endotelial. El objetivo de este estudio fue evaluar el rol de la TM en la fisiopatología del SUH. Para ello se aislaron y purificaron CE de la microvasculatura del glomérulo de riñón humano, y se evaluó la expresión de TM por ELISA in situ en respuesta a la Stx2 sola (5nM), y en combinación con TNF (10 ng/ml), LPS (1 mg/ml) y PMN (2x10⁶/ml). La TM disminuyó en respuesta al tratamiento con Stx2+TNF (Control: 1.07+0.12; Stx2:0.84+0.08; TNF:0.70+0.07; tx2+TNF*:0.40+0.11,* p<0.05). Los PMN per se provocaron un aumento de la TM que disminuyó cuando se preincubaron con Stx2 (Control: 0.3+0.02; PMN: 0.60+0.07, p<0.05 vs control; PMN+Stx2:0.45+0.02,p<0.05 vs PMN). Cuando se evaluó la síntesis de proteínas por incorporación de 3H-leucina, se encontró disminuida con Stx2+LPS y Stx2+TNF (30 y 52% de inhibición). La cicloheximida (0.1mg/ml) inhibió similarmente la síntesis de proteínas (33%), pero no modificó los niveles de TM. La Stx, en combinación con factores y células proinflamatorias, podría contribuir en el estado trombotico del SUH, al menos en parte, disminuyendo la TM en las CE del glomérulo renal.

229. Evaluación de la respuesta de los neutrófilos (PMN) de niños con Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en la etapa aguda y recuperados frente a diferentes citoquinas activadoras. Gabriela C. Fernández(1), Carolina J. Rubel(1), Sonia Gómez(1), Alejandra V.E. Capozzo(1), Paula Barrionuevo(1), Ramón Exeni(2), Irene Grimoldi(2), Martín A. Isturiz(1), Marina S. Palermo(1).

(1)Inst. Investigaciones Hematológicas. Acad. Nacional de Medicina (2)Depto. Nefrología. Hospital Municipal del Niño, La Matanza
gabferan@hotmail.com

El SUH es la primer causa de falla renal aguda en niños. Se ha documentado la presencia de IL-8 y TNF- α , y/o elastasa en el suero de estos pacientes, sugiriendo que los PMN activados contribuyen al daño endotelial. Previamente describimos que los PMN de niños con SUH presentan menor expresión de CD66b, CD11b y CD16, considerándose marcadores de degradación, y menor actividad lítica. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de respuesta de los PMN frente a citoquinas. Se incubaron PMN de niños con SUH con distintas concentraciones de las citoquinas activadoras de PMN: TNF- α , IL-8 y G-CSF, y se estudió por citometría el aumento en la expresión de CD66b, CD11b y CD16, respecto al basal. Se comparó con los pacientes recuperados, niños sanos (C) y adultos, como parámetro de referencia. Los niños con SUH agudos mostraron un menor aumento en la expresión de CD66b frente a las tres citoquinas respecto a los C:50 pg TNF- α : SUH (n=8):1.4+0.1; C(n=12): 2.1+ 0.2, p<0.05; 50ng IL-8: SUH:1.4+0.1; C:1.8+0.1, p<0.05; 10 ng G-CSF:SUH: 0.9+0.1; C:1.5+0.1, p<0.05. Contrariamente los SUH recuperados muestran el máximo aumento. No hubo diferencias en la inducción de CD11b y CD16. Concluimos que los PMN de niños con SUH agudos tienen una menor capacidad de respuesta frente a diferentes citoquinas, sugiriendo que la deactivación es consecuencia de una hiperactivación temprana seguida de un agotamiento funcional, más que secundaria a la presencia de factores inhibidores en plasma.

230. Diferente susceptibilidad a la fludarabina de las poblaciones T CD4+ y CD8+ en leucemia linfática crónica de células B (LLC-B). Romina Gamberale(1), Paula Fernández Calotti(1), Mónica Vermeulen(1), Mariano Scolnik(1), Guillermo Arrosagaray(1), Jorge Geffner(1), Mirta Giordano(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina
mailto:rominagamberale@hotmail.com

La fludarabina (FLU) es una droga de elección en el tratamiento de la LLC-B, pero su uso se ve limitado ya que provoca una sos-

tenida linfopenia T. Nuestro objetivo fue analizar la susceptibilidad de las poblaciones T CD4+ y CD8+ a la FLU, para lo cual se incubaron células mononucleares de pacientes LLC-B y dadores normales con FLU (1-25 ug/ml) y se determinó la relación CD4/CD8 en la región de células viables mediante análisis por citometría de flujo. En todos los pacientes estudiados (n=8) la población CD8+ fue más sensible a la FLU: relación CD4/CD8 en Ct vs FLU: 1.1 vs 5.2, 0.7 vs 2.3, 3.1 vs 6.6, 1.1 vs 1.8, 0.9 vs 2.4, 3.2 vs 4.9, 2.1 vs 5.5, 2.4 vs 12.0. Seis de los 8 normales mostraron valores en el mismo sentido. Estos resultados se confirmaron marcando las células apoptóticas dentro de cada población con anexina V-FITC. Ya que in vivo los niveles de linfocitos CD4+ se recuperan más tardíamente que los CD8+, evaluamos si ambas poblaciones responden en forma distinta a la activación en presencia de FLU. Para ello las células se activaron con anti-CD3 y se analizó la expresión de CD25 en cada población, encontrándose mayor expresión en los CD8+ (7 de 9 pacientes): % de células CD4+CD25+ vs CD8+CD25+: 51±6 vs 71±4, media±ES, p<0.05. En 4 de estos 7 pacientes la diferencia fue mayor post-FLU. Estos resultados podrían explicar, al menos en parte, la más pronta recuperación de la población T CD8+ en los pacientes tratados con FLU.

231. Estudio de Autoanticuerpos (Ac), Autoinmunidad Sistémica y Tiroidea en Pacientes con Miastenia Gravis (MG). Sebastián A. Grimaudo(1), Silvana T. Roveto(2), Guillermo Menga(3), Jorge A. Manni(1), Daniel A. Rimoldi(2).

(1)Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Médicas «Alfredo Lanari» UBA (2)Departamento de Endocrinología. Instituto de Investigaciones Médicas «Alfredo Lanari» UBA (3)Hospital Municipal de Rehabilitación Respiratoria «M. Ferrer»

La MG puede asociarse a alteraciones autoinmunes sistémicas y específicas (ej. tiroidea). Con el objetivo de efectuar esta evaluación se estudiaron 60 pacientes con MG (37 mujeres y 23 hombres), edad media 45 años. Se investigó anti-receptor de acetilcolina (ACRA) en 49 pacientes, 42 fueron positivos. Se estudiaron Ac contra: fracción microsomal (aFM), receptor de TSH (Trab), músculo estriado, Sm, RNP, Ro, La, centrómero, Scl70, Jo1, Prib, histonas, DNAn, núcleo (ANA) y factor reumatoideo (FR). Se detectaron Ac en 24 pacientes (40.0 %): ANA en 11, a-ADNn en 9, aFM en 9, Trab en 6, a-histonas en 4, a-RNP en 2, FR en 1 y a-Ro en 1. De los 31 con timentomía (Tx): 22 tenían hiperplasia, 7 timomas y 2 involutos. La frecuencia de Ac en Tx fue 48.5% y en no Tx 31.0%, p=0.13. Se comparó la detección de a-DNAn y/o ANA entre Tx (29.0%) y no Tx (11.5%), p=0.06. Al comparar los niveles de Trab en ACRA+ (12.2%) y ACRA-(0.0%) no se observó diferencia significativa (p>0.05). Todos los Trab+ fueron ACRA+. Tres pacientes presentaron disfunción tiroidea clínica. Un caso con 4 criterios diagnósticos para lupus eritematoso sistémico (LES): eritema malar, artritis, ANA y a-DNAn. Los Tx tienden a mostrar mayor frecuencia de ANA y/o a-DNAn. Algunos de los pacientes con aFM y/o Trab evidenciaron disfunción tiroidea clínica. En el grupo de pacientes con MG se encontró una frecuente y variada alteración autoinmune humoral mucho mayor que la asociación clínica con otra enfermedad autoinmune.

232. Interpretación según edad de la respuesta a la vacuna neumococcica en pacientes con infecciones recurrentes. María G. Nenda(1), María I. Gaillard(1), Viviana D. Menard(1), Liliana Bezrodnik(1), Eva M. Rivas(1).

(1)Hospital de Niños Ricardo Gutierrez Capital Federal graciela17@ciudad.com.ar

Los síndromes de deficiencias de anticuerpos son una causa importante de infecciones recurrentes en la niñez. La respuesta a la vacunación con polisacáridos neumocócicos es una herramienta útil en la evaluación de la competencia inmune en estos pacientes. Teniendo en cuenta que esta respuesta es dependien-

te de la edad; fue nuestro interés evaluar en 40 pacientes (rango de edad 2-18 años) con historia de infecciones recurrentes la respuesta específica a los serotipos(S) 14,5,1,6B,7F y 3 que son los de mayor prevalencia según la última revisión de la Organización Panamericana de la Salud. Métodos: se determinó la respuesta serotipo específica pre(Basal) y 20-30 días post-vacunación (Estimulado), por ELISA. Se consideran títulos protectores a valores >= 1,3ug/ml para cada serotipo. Resultados: - 8 pacientes no cumplieron los criterios de respuesta positiva (títulos < 1,3ug/ml) - 32 pacientes con criterio de respuesta positiva fueron divididos según edad en dos grupos:

	Grupo1(G1) n:12 <5 años		Grupo2(G2) n:20 >5 años	
	Basal* (ug/ml)	Estimulado* (ug/ml)	Basal* (ug/ml)	Estimulado* (ug/ml)
S1	0,99	4,95	1,2	5,98
S3	Nd**	2,59	1,33	2,32
S5	0,97	4,55	1,17	4,55
S6B	0,77	3,13	0,78	4,45
S7F	0,92	4,37	0,86	2,57
S14	1,0	2,80	2,31	12,4

*valor promedio de cada serotipo **No determinado

Comentarios: Los serotipos de mayor respuestas fueron diferentes de acuerdo al grupo etareo:S1,S5y S7F para el G1;y S14,S1 y S5 para G2. Observamos respuestas significativamente mayores en el G2 respecto del G1 para el S14 (p0,0009). En el G1 los títulos basales no fueron protectores para ningún serotipo, mientras que en el G2 se encontraron para los S14 y S3

233. Linfoma de Hodgkin asociado a Epstein Barr en un paciente con inmunodeficiencia primaria combinada severa. Nélica M. Villa(1), María I. Gaillard(1), María V. Preciado(1), Paola A. Chabay(1), Elena De Matteo(1), Liliana Bezrodnik(1).

(1)Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutierrez lbezrodnik@intramed.net.ar

Las inmunodeficiencias combinadas severas (IDCS) son la forma más grave de inmunodeficiencias primarias. En 1990 Brooks describió una IDCS caracterizada por disminución de CD4+, CD8+, CD45RO+ y RA+, respuesta a mitógenos y respuesta funcional de anticuerpos alterada, CD 20+ e Ig totales normales, varicela severa y verrugas diseminadas. Los individuos con IDCS tienen mayor incidencia de neoplasias linfoides, usualmente linfomas no-Hodgkin, asociadas al virus de Epstein Barr (EBV). Presentamos un caso de un niño con IDCS que desarrollo un linfoma de Hodgkin (LH) asociado a EBV. Sobre cortes de biopsia ganglionar fijada se investigó la presencia de EBV por hibridización in situ para EBERs e inmunohistoquímica para LMP-1 y sobre biopsia ganglionar en fresco se hizo la tipificación por PCR. A los 17 meses por infecciones recurrentes se le diagnosticó una IDCS con: CD20+ 46 cel/ml (1%), CD3+ 2374 cel/ml (49%), CD4+193 cel/ml (4%), CD8 2180 cel/ml (45%), CD56+ 1500 cel/ml (31%) y DR 242 cel/ml (5%), IgG 1200 mg/dl y respuesta a mitógenos ausente. Como antecedente familiar tiene un hermano con IDCS que a los 3 años presentó varicela hemorrágica y verrugas por HSV. A los 7 años desarrolla un LH de tipo celularidad mixta con EBERs y LMP-1 + y por PCR EBV-2. La IDCS del paciente es compatible con lo descrito por Brooks. El desarrollo de LH no es usual en pacientes con IDCS y el EBV estaría asociado a su linfomagénesis.

234. Evaluación de parámetros clínicos y bioquímicos en sangre periférica de pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y disfunción multiorgánica (DOM). Evangelina E. Agriello(1), Mabel S. Rizzo(1), Víctor Bernardis(1), Carlos Sola(1), Susana N. Garbiero(1), Marta Roque(1), Eduardo H. Chuluyan(2).

(1) *Serv. Hematología, Laboratorio y UTI del HIGA Dr. Penna, Cát. Fisiología Humana, UNS, Bahía Blanca*
 (2) *Inmunogenética, Hosp. de Clínicas, Fac. Medicina, UBA*
 mailto: chulu@interar.com.ar

Objetivo: evaluar los valores absolutos de células dendríticas(DC) plasmocitoides CD123+(DCp) y mieloides CD11c+(DCm) en pacientes en terapia intensiva(UTI), relacionándolos con la clínica y parámetros bioquímicos como proteína C reactiva (PCR) y procalcitonina (PCT). Métodos: se analizaron 18 adultos sanos y 23 pacientes de UTI, clasificándolos según score APACHE II. Las muestras de sangre se obtuvieron cada 48hs, realizando un recuento leucocitario con contador hematológico e inmunofenotipo de las DC. La PCR y PCT se cuantificó por método turbidimétrico e inmunocromatográfico. Resultados: al ingreso los pacientes presentaron niveles bajos de DC comparados con el grupo control (DCp: 1.9 ± 2.5 vs 14.4 ± 6.7 ; DCm: 7.7 ± 7.3 vs 22.6 ± 6.9 ; $p < 0.0001$). La recuperación en los valores de DC (DCp: 4.9 ± 2.7 ; DCm: 15.6 ± 6.3), la disminución de PCR (Mna=2mg/dl) y PCT < 0.5 ng/ml se correlacionó con una evolución favorable. Los pacientes con evolución desfavorable (10) mantuvieron valores bajos de DC y altos de PCR y PCT. También se observó diferencias significativas ($p < 0.01$) en los valores de DC y correlación entre los valores de APACHE II y DC123+ ($r = -0.73$), según el cuadro clínico (SIRS vs DOM). Conclusión: i) existe una disminución de DC en sangre periférica de pacientes internados en UTI; ii) la evolución clínica favorable se correlaciona con un aumento en DC y disminución de PCR y PCT; iii) los pacientes en DOM presentan menores recuentos de DC comparados con los SIRS.

235. Participación de los LTgamma/delta en el trasplante renal alogeneico humano. Andrea L. Racca(1), Alejandra S. Bailat(1), María I. García(1), Florencia Quiroga(2), Adriana Soutullo(1), Ileana Malan Borel(1).

(1) *Cátedra de Inmunología Básica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - UNL* (2) *Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas «José de San Martín». UBA*
 mailto: aracca@fcb.unl.edu.ar

Dentro de la población de LT CD3+ existe una pequeña subpoblación de LT TCR-gamma/delta, cuya función no ha sido aún completamente dilucidada. Se ha demostrado su efecto sobre ciertas células tumorales y su capacidad de secretar, a diferencia de los LT TCRalpha/beta, interluquinas preferentemente tipo 2, promotoras de la aceptación del injerto. A efectos de analizar la participación de los LTgamma/delta en el trasplante renal alogeneico humano, la expresión de TCR gamma/delta y alpha/beta, en las subpoblaciones CD3+ CD4+ y CD3+ CD8+, fue determinada por citometría de flujo, en sangre periférica proveniente de pacientes con rechazo agudo (RA), crónico (RC), y en los que transcurrían con buena evolución (BE), así como en individuos sanos. En LT CD4+ o CD8+, los niveles de LTalpha/beta fueron menores en los pacientes trasplantados que en individuos sanos ($P < 0.001$), no observándose diferencias entre LTgamma/delta ($P > 0.05$). Los niveles de LTgamma/delta CD8+ fueron superiores, ($P < 0.05$), en BE ($4.96 \pm 3.15\%$) que en RC ($1.01 \pm 0.76\%$), a diferencia de lo observado en la población de LTalpha/beta, CD4+ o CD8+. En esta población los niveles fueron mayores, ($P < 0.05$), en pacientes con RC: $8.90 \pm 6.78\%$ (CD4+), $4.49 \pm 4.09\%$ (CD8+); que en los de BE: $1.44 \pm 1.13\%$ (CD4+), $0.27 \pm 0.21\%$ (CD8+). Estos resultados permitirían atribuir a los LTgamma/delta una participación en los mecanismos de aceptación del injerto alogeneico.

236. Respuesta inmune contra el gangliósido GM3 en pacientes con melanoma bajo tratamiento con la vacuna GM3-VSSP/Montanide. Ariel Carnero(1), Marcelo Guthmann(1), Gabriela Cinat(2), Daniel Lewi(3), Leonardo Koliren(4), Edith Soto(4), Marcelo Muiño(3), Adolfo Marantz(3), Roberto Bitton(5), Leonardo Fainboim(1).

(1) *Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas «José de San Martín», Facultad de Medicina, UBA* (2) *Instituto «Angel Roffo»* (3) *Hopital «Juan Fernández»* (4) *Hopital «Carlos Durand»* (5) *Laboratorios Elea*
 arielcarnero@ciudad.com.ar

Con el objetivo de estudiar la respuesta inmune contra el gangliósido N-acetilGM3, un antígeno glicolipídico asociado a tumor, 18 pacientes con melanoma de estadio IV bajo tratamiento con la vacuna GM3-VSSP/Montanide fueron evaluados mediante ensayos de linfoproliferación, secreción de IFN gamma y producción de anticuerpos. La vacuna se compone de proteoliposomas de muy pequeño tamaño (VSSP), derivados de la proteína de membrana externa (OMP) de la bacteria N. meningitidis, conjugados hidrofólicamente al GM3, y mezclados con el adyuvante Montanide ISA 51. El tratamiento comprende 9 aplicaciones de la vacuna en forma intramuscular. Se evaluaron 3 niveles de dosis. Los resultados indican que la vacunación genera una fuerte respuesta celular y humoral contra el carrier, con índices de proliferación de hasta 63, secreción de IFN gamma de hasta 2500 pg/ml/100.000 células mononucleares y títulos de anticuerpos de tipo IgG de hasta 750.000, con predominio de las subclases IgG1 e IgG2. Por otro lado, el 25% de los pacientes produce anticuerpos de tipo IgM específicos contra el GM3 en respuesta al tratamiento. Se observó una respuesta linfoproliferativa al GM3 en células estimuladas con GM3-liposomas de una paciente que sufrió un episodio de DLT. Los demás pacientes sólo desarrollaron toxicidades leves. Estos resultados demuestran que la tolerancia al GM3 puede romperse mediante su administración junto al VSSP, generando una respuesta específica contra el gangliósido.

237. Cambios en la calidad de la respuesta inmune humoral contra un antígeno proteico provocados por diferentes adyuvantes y/o una infección viral simultánea. Karina A. Gómez(1), Silvia A. Longhi(1), Verónica J. Marino(1), Patricia A. Mathieu(1), María E. Loureiro(1), Jean-Paul Coutelier(2), Leonor P. Roguin(1), Lilia A. Retegui(1).

(1) *IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires* (2) *Unit of Experimental Medicine. Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.*

Definimos la calidad de la respuesta inmune humoral como la concentración de anticuerpos (Ab), determinada en un ELISA de competencia, dirigidos contra epitopes nativos - o expuestos - de un antígeno soluble. Se estudió el efecto de diferentes adyuvantes - Freund's Completo (CFA), monofosforil lipido A (MPL) y Alumen (Al) -, así como la infección con el virus elevador de la lactato deshidrogenasa (LDV), sobre la calidad de los Ab anti hormona de crecimiento humana (anti-hGH) inducidos en ratones CBA/Ht y BALB/c libres de gérmenes y convencionales. Se halló que dicha calidad fue similar en los ratones CBA/Ht inmunizados con CFA y MPL, mientras que el LDV disminuyó la cantidad de Ab anti-epitopes nativos de la hGH en estos últimos. Por el contrario, la respuesta en los animales BALB/c inoculados con Al y MPL fue mejor que la obtenida con CFA, y la infección con LDV no modificó la calidad de los Ab en ninguno de los tres casos. Además, cuando se realizaron ensayos de western-blot para detectar autoAb dirigidos contra diferentes tejidos murinos, se encontró una correlación positiva entre la presencia de autoAb y la concentración de Ab contra epitopes cripticos de la hGH. Los datos obtenidos indican que, según el protocolo de inmunización y el estado de salubridad del huésped, pueden obtenerse antisueros de alta concentración de Ab pero de baja calidad, así como autoAb, y que estos hechos deben ser contemplados en el diseño de vacunas basadas en el uso de antígenos proteicos. Sist. Cardiovascular I

238. Relación entre compliance arterial y microalbuminuria en pacientes diabéticos tipo II con hipertensión arterial. Jorge E. Toblli(1), Marta Costa(2), Pablo Piorno(2).

(1) *Sección Hipertensión arterial Hospital Alemán.* (2) *Laboratorio Central, Hospital Alemán.*
 mailto: jtoblli@hospitalaleman.com

La pérdida de complacencia arterial esta asociada a mayor morbimortalidad. La velocidad de la onda de pulso (VOP) es un indicador de compliance arterial (CA) así como lo es la microalbuminuria para daño endotelial. Nuestro objetivo fue determinar en pacientes con diabetes tipo II e hipertensión arterial no fumadores la relación entre microalbuminuria (MA) y CA. Se enrolaron 45 pacientes (20 muj. y 25 hom.), de 57 + 8 años (rango 33-69) diabéticos (DM) tipo II con hipertensión arterial (HA) (>140/90mmHg). Se determinó: 1) Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD); 2)MA; 3)VOP, con un equipo computarizado (COMPLIOR®); 4)Relación cintura/cadera (W/H); 5) Masa corporal (BMI); 6)Glucemia (GLU); 7)Hemoglobina glic. (HbA1). 8) Tiempo de DM (TDM); 9)Tiempo de HTA (THA). Se realizó regresión múltiple (RM) (variable constante = MA). Resultados (media + DS): 1)PAS (mmHg) 158,3 + 11,2; 2)PAD (mmHg) 99,5 + 6,5; 3)MA (mg/día) 103,6 + 39,4; 4)VOP (m/seg) 12,7 + 2,1; 5)W/H 0,98 + 0,06; 6)BMI 30, 2 + 5,1; 7)GLU (mg/dl) 125,6 + 8,9; 8)HbA1 7,27 + 0,91; 9)TDM (años) 5,6 + 4,3; 10)THA (años) 6,1 + 4,8. RM indicó que VOP fue la variable más influyente en el grado de MA ($r = 0,9507$ $p < 0,001$). Estos resultados sugieren una estrecha relación entre CA y MA en pacientes con DM tipo II e HA.

239. Actividad mecánica del miocardio y producción mitocondrial de NO y H₂O₂ en el envejecimiento. Pablo La Padula(1), Gabriela D'Amico(2), Silvia Loes Arnaiz(2), Alberto Boveris(2), Lidia E. Costa(1).

(1)Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA. (2)Laboratorio de Biología de Radicales Libres, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.
mailto:pablolapa@hotmail.com

Según la hipótesis de los radicales libres el envejecimiento estaría vinculado a una disfunción mitocondrial, en particular en los tipos celulares postmitóticos, como los cardiomiocitos. Recientemente se ha propuesto a la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) como regulador de la respiración mitocondrial in vivo, aunque algunos discuten su relevancia en corazón. Utilizando 10 ratas jóvenes (J: 3-4 meses) y 10 seniles (S: 19-22 meses) se estudió la actividad mecánica del músculo papilar aislado, en condiciones isométricas, y la producción de NO y H₂O₂ y la actividad de MnSOD, por métodos espectrofotométricos y espectrofluorométricos, en las mitocondrias aisladas de la masa ventricular. Resultados ($\bar{x} \pm SE$). Tensión desarrollada (g/mm²), J: 4.2 ± 0.5 , S: 1.9 ± 0.5 ; Máxima velocidad de contracción (g/mm².s), J: 71 ± 10 , S: 28 ± 7 ; Máxima velocidad de relajación (g/mm².s), J: 34 ± 4 , S: 15 ± 3 ; todos $p < 0.01$. El tiempo a la tensión pico y el tiempo medio de relajación fueron similares en ambos grupos. Actividad de mtNOS (nmol/min.mg protein), J: 1.04 ± 0.10 , S: 0.75 ± 0.07 , $p < 0.05$; Producción de H₂O₂ (nmol/min.mg protein), J: 0.83 ± 0.09 , S: 0.37 ± 0.06 , $p < 0.01$. La actividad de MnSOD no varió. La declinación de los parámetros funcionales del miocardio en el envejecimiento podría estar asociada a una alteración en la regulación de la función mitocondrial por la menor actividad de mtNOS, mientras que la producción de especies activas del oxígeno estaría disminuida.

240. Ritmos ultradianos de presión arterial de muy baja frecuencia en la hipertensión esencial. Santiago Perez Loret(1), Alejandro García Aguirre(2), Gerardo Nau(2), Jorge E. Toblli(2).

(1)Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Bs As, Argentina. (2)Sección Hipertensión Arterial, Hospital Alemán, Bs As, Argentina.
mailto:jtoblli@hospitaleman.com

Se investigó la presencia de ritmos ultradianos (periodo 6-12 hs) de muy baja frecuencia (RUMBF) en presión sistólica (PS), diastólica, media (PAM) y frec. cardiaca, y su relación con la intensidad de la hipertensión arterial (HA), en una población de hipertensos esenciales (HE) con o sin medicación. Se enrolaron 186 pacientes con diagnóstico de HE de ambos sexos. En todos los casos se practicó MAPA de 24±1,5 hs. Con los registros se

construyeron series temporales extendidas por un método validado por nosotros mismos. Estos registros se procesaron por el método de Transformación Rápida de Fourier (FFT). Como medidas de la intensidad de la HA se usaron índices obtenidos de la MAPA: % de mediciones sistólicas diurnas >135 mmHg (S>135) y nocturnas >115 mmHg, % de diastólicas diurnas >85 mmHg y nocturnas >75 mmHg (D>75). Para el análisis se utilizó MANOVA y Rho de Spearman ajustado para edad, BMI y tratamiento farmacológico. Se identificaron dos ritmos con periodo 7,6 h (p1) y 11,7 h (p2) en las 4 variables analizadas. La amplitud de estos ritmos no se vio modificada por el tratamiento farmacológico. Se establecieron correlaciones entre la amplitud de los ritmos y los índices de intensidad de la HA. En PS, S>135 y p1 ($r = 0,148$ $p = 0,04$), S>135 y p2 ($r = 0,203$ $p = 0,01$). En PAM S>135 y p2 ($r = 0,156$ $p = 0,03$); D>75 y p2 ($r = -0,145$ $p = 0,05$). Estos resultados indicarían que hay RUMBF en la presión arterial sistólica, cuya amplitud aumenta a medida que se intensifica la hipertensión arterial.

241. Influencia de varios métodos empleados para obtener preparaciones vasculares aisladas sobre la función endotelial de las mismas. Gustavo J. Rinaldi(1).

(1)Cátedra de Fisiología Humana, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP
mailto:rinaldi@nahuel.biol.unlp.edu.ar

Se exploró la posibilidad de que algunas maniobras empleadas para obtener anillos vasculares afecten su relajación endotelio-dependiente (EDR). Se estudió en anillos de aorta de rata la influencia de: 1) Tipo de anestesia, 2) Almacenamiento en frío (4°C) por 24 Hs, 3) Duración de la estabilización, 4) Contracciones repetidas durante la misma, y 5) Lavados durante la misma. Seis contracciones repetidas no alteraron la respuesta a noradrenalina 0,1 micromolar (NA) (1155 ± 109 mgF/mgT) ni la relajación por acetilcolina 1 micromolar (Ach) ($30 \pm 3\%$). La anestesia con pentobarbital y el almacenamiento en frío deprimieron la EDR en $18 \pm 2\%$ y $30 \pm 3\%$ respectivamente pero no la respuesta contráctil a NA. La duración de la estabilización no alteró la contracción ni la EDR haciendo lavados repetidos; pero la ausencia de lavados durante la misma potenció la respuesta a NA de 1219 ± 81 a 1579 ± 122 mgF/mgT y a ClK 80 mM de 1050 ± 77 a 1818 ± 95 mgF/mgT. Este aumento de fuerza fue prevenido por el raspado endotelial o, en preparaciones con endotelio intacto, mediante lavados repetidos durante la incubación o incubando con Bosentan 22 micromolar y sin lavados. Se concluye que: 1) El tipo de anestesia empleada y el almacenamiento en frío pueden deprimir la EDR aún sin afectar la respuesta contráctil del músculo liso vascular, y 2) La acumulación de endotelina durante el periodo de incubación puede producir cambios en la contracción aunque no se vea afectada la tensión de reposo.

242. La adenosina atenúa la disfunción postisquémica a través de los receptores A1 y de los canales de K⁺ ATP. Verónica I. D'Annunzio(1), Martín Donato(1), Celina M. Morales(1), Melina Sabán(1), Omar Scapín(2), Ricardo J. Gelpi(1).

(1)Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Dpto de Patología, Fac de Medicina, UBA (2)Fundación Grupo de Estudios Multicéntricos en Argentina (GEMA)
mailto:mndonato@fmed.uba.ar

La adenosina (ADO) administrada durante la reperfusión (R) atenúa las alteraciones sistólicas de la disfunción postisquémica. El objetivo fue determinar la participación de los receptores A1 y de los canales de K⁺ATP como mediadores de los efectos protectores de la ADO y si la administración de estos compuestos modifica el tamaño de infarto. Se utilizaron corazones aislados e isovolúmicos de conejo perfundidos según la técnica de Langendorff. Grupo 1 (n=14) fue sometido a 15 min de isquemia global seguida por 30 min de R. En el Grupo 2 (n=16) se repitió el protocolo del G1 pero se administró ADO (0.3 mg/kg/min) desde el inicio de la R. En el Grupo 3 (n=12) y en el Grupo 4 (n=9)

se repitió el protocolo del G2, pero se administró un bloqueante selectivo de los receptores A1 (DPCPX, 200 nM), y un bloqueante no selectivo de los canales K+ATP, respectivamente (glibenclamida, 0.3 µM), en presencia de ADO. Se calculó la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI, mmHg) y se midió el tamaño de infarto (porcentaje del área del ventrículo izquierdo). $X \pm ES$. $p < 0.05$

	Control	PDVI (mmHg) 30 min R	Infarto (%)
G1	103.8±2.9	57.7±2.2	2.7±0.8
G2	104.2±3.1	79.5±4.8*	4.3±1.6
G3	98.8±4.3	51.1±3.4	10.7±1.3*
G4	106.5±5.4	67.6±8.7	12.7±2.2*

La ADO atenuó la disfunción contráctil a través de la activación de los receptores A1 y de los canales de K+ATP; sin modificar el tamaño de infarto.

243. Efecto de la restricción del aumento de peso sobre la viscosidad sanguínea en un modelo de obesidad hipertriglicéridémica. Gladis Hernández(1), María C. Gayol(2), Luis Cinara(3), Graciela Bazzoni(3), Marta Rasia(3).

(1)Cátedra de Biofísica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. (2)Cátedra de Biología. Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Rosario. (3)Cátedra de Biofísica. Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Rosario. hgladis@hotmail.com

La línea IIMb/Fmb (modelo de obesidad hipertriglicéridémica y diabetes) presenta: mayor viscosidad sanguínea (VS), menor deformabilidad eritrocitaria (DE) y mayor agregabilidad eritrocitaria que la línea eumetabólica, y metabolismo influenciado por la dieta. Se estudió el efecto de la restricción alimentaria sobre la VS y plasmática (VP) en ratas obesas, y la relación con: triglicéridemia (TG), colesterol (col) y glicemia (gly). Al destete se dividieron los animales en dos grupos: A: (n=12) alimentados ad libitum, y B (n=22): oferta alimentaria 30% menor. A los 200 días, se determinaron: Hematocrito (Hto), TG, Col, y Gly; fibrinógeno (Fb), VS, VP, y DE. Estadística: Test t de Student (datos no apareados) y correlación. Resultados: disminución de: Hto (t=5.82), masa corporal (MC) (t=12.24), TG (t=11.85), Gly (t=2.85), Fb (t=2.18) y VS (t= 8.91) y aumento de Col (t=-14.58), no difirió significativamente VP (t=-0.94) ni la VS a Hto 40% (VS40). La VS40 se asoció con TG (r=0.536), Col (r=-0.415) y Gly (r=0.418) y con DE (r=0.589). En las ratas obesas alimentadas ad libitum la mayor VS se asocia a la disminución de DE, y esta al aumento de TG y de Col. En las ratas con restricción alimentaria la no modificación de la VS40 ni de la DE puede atribuirse a que la disminución de TG se compensa con el aumento de Col, siendo el estado de stress que les causa la restricción alimentaria posiblemente el motivo de la hipercolesterolemia.

244. Perfil hemorreológico comparativo en vasculopatías. Patricia Foresto(1), Mabel D'Arrigo(1), Fernando Filippini(2), Larisa Carrera(2), Rodolfo Rasia(3), Juana Valverde(1).

(1)Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR (2)Facultad de Ciencias Médicas. UNR (3)IFIR-CONICET-UNR <mailto:darrigomabel@yahoo.com.ar>

El objetivo de este trabajo fue evaluar el perfil reológico en dos grupos de riesgo: diabéticos e hipertensos, estudiando agregación eritrocitaria, viscosidad sanguínea y fibrinógeno. Se estudiaron 19 pacientes hipertensos (HTA), 55 diabéticos (DBT) y 23 individuos normales (N). Las medidas de viscosidad (V) se realizaron en sangre entera (VSE) y plasma (VP) con un viscosímetro. Se calculó la viscosidad relativa (VR) como el cociente de VSE/

VP. 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 fibrinógeno (F) se hizo con un coagulómetro CLOAT. Los valores encontrados en pacientes con HTA fueron: ASP = 0.69±0.11, VR = 4.66±2.11, VP = 1.79±0.42 y F=265±70; en pacientes DBT ASP = 0.65±0.18, VR = 3.73±1.14, VP = 2.24±0.86 y F=375±75 y en normales ASP = 0.29±0.12, VR = 3.29±0.28 VP = 1.85±0.63 y F=245±40. Aplicando el test U de Mann Whitney se concluye que existe diferencias altamente significativas respecto de los individuos normales, en los valores de VP, ASP y F en pacientes DBT mientras que en pacientes con HTA las mayores diferencias se hallaron en los valores de ASP y VR. Las alteraciones halladas en los distintos parámetros analizados señalan una posible vinculación con los mecanismos responsables de las complicaciones vasculares

245. Modificaciones de los parámetros hemorreológicos celulares por terapia hormonal de reemplazo (THR) Modificaciones de los parámetros hemorreológicos celulares por terapia hormonal de reemplazo (THR). María I. Spengler(1).

mail to mrasia@lycos.com

Existe evidencia de que la THR puede disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular, pero los mecanismos de este efecto no están claros. En trabajos anteriores analizamos las variaciones en los factores hemorreológicos (FH) plasmáticos por THR, en el presente estudiamos los FH celulares: 1) deformabilidad eritrocitaria, por filtrabilidad (a través de membranas con poros de 5 µm) y estimada por el índice de rigidez (IR); 2) viscosidad sanguínea relativa al plasma corregida a un hematocrito del 45% (nrc). Las viscosidades fueron medidas con viscosímetro cono-plato. Pacientes: 32 mujeres menopáusicas en condiciones basales y a los 6 y 12 meses de THR. Estadística: ANOVA, test Newman-Keuls para comparaciones. Correlación. Se comprobó que la nrc disminuyó a los 6 meses de tratamiento (F=16,97; p<0.01) y los valores no variaron en los 6 meses siguientes. Igual comportamiento mostraron los valores de IR (F=7,19; p<0.01). Estos 2 últimos parámetros correlacionaron en forma positiva y significativa tanto en la instancia basal (r=0,54; p<0.01), como a los 6 (r=0,46; p<0.01) y a los 12 meses (r=0,36; p<0.05), evidenciando una relación causa-efecto. Estos resultados demuestran que el tratamiento produce mejoras en la deformabilidad eritrocitaria y en la viscosidad sanguínea relativa, factores determinantes del pasaje de glóbulos rojos a través de los capilares sanguíneos, sugiriendo un mecanismo por el cual la THR disminuiría el riesgo de enfermedad cardiovascular en mujeres menopáusicas.

246. Efectos de la Adrenalina sobre el electrocardiograma en un modelo de ratas infectadas con Trypanosoma cruzi.

Héctor H. Berra(1), Rubén Cavoduro(2), Stella M. Pezzotto(3), Silvia S. Revelli(3).

(1)Cátedra Fisiología Humana. Facultad Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. (2)Cátedra Farmacología. Facultad Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. (3)Instituto Inmunología. Facultad Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. hbonar@hotmail.com

La administración intravenosa de adrenalina (A) posee efecto arritmogénico sobre el corazón de la rata. El objetivo de este trabajo fue observar si este efecto se hallaba exacerbado en animales infectados con Tc (Medicina 1980, 40: 69). Se utilizaron 8 ratas 'I' testigos (G1) y 8 ratas infectadas al destete con 1 millón de tripomastigotes de la cepa Tulahuén (G2). Veinte días postinfección se les cateterizó bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg / kg), la arteria y la vena femorales. El catéter arterial se conectó a una columna de mercurio, midiéndose en forma continua la presión arterial (PA). Simultáneamente se registró en forma continua la derivación DII del electrocardiograma

para monitorizar frecuencia cardíaca (FC) y aparición de latidos prematuros (LP). Se obtuvieron registros basales y luego de la inyección de 15 µg / kg de A endovenosa, en dosis única. En G2 la FC basal (media +/- ds) (359 +/- 37) y la PA basal (81 +/- 7) fueron más bajas que en G1 (404,9 +/- 35 y 93,9 +/- 5, respectivamente) $p < 0.05$. Con A la PA aumentó significativamente en todos los animales, seguido de un descenso de la FC. El número de LP fue mayor en G2 (15.6 +/- 13) que en G1 (8.9 +/- 3.18) sin alcanzar significado estadístico utilizando el test 't' para variancias distintas, mientras que si difirió la cantidad de LP complejos (7/8) en G2 vs (1/8) en G1, $p < 0.05$. Los animales infectados mostrarían una mayor sensibilidad a los efectos arritmogénicos de la A.

247. Efectos del acondicionamiento isquémico (PI) sobre el corazón de rata sometido a isquemia-reperusión (I-RP).

Alicia Varela(1), María G. Marina Prendes(1), Gustavo Testoni(1), Andrea Ruibal(2), Diana Grinspon(2), Juan Perazzo(2), Enrique A. Savino(1).

(1)Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA - Inst. de la Química y el Metabolismo del Fármaco, CONICET (2)Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA avarela@huemul.ffyb.uba.ar

En corazón de rata sometido a isquemia global (I) - reperusión (RP), el PI atenúa las alteraciones funcionales. Se investigó para establecer si estos efectos se acompañan de una reducción del tamaño del infarto y de la acumulación de metabolitos de los ácidos grasos. Corazones perfundidos Langendorff de ratas alimentadas (AL) o ayunadas 24 h (AY) fueron sometidos a 25 min de I y 30 min de RP. El PI consistió en un episodio de 3 min de I y 5 min de RP previos a la I sostenida. Se determinó el porcentaje de viabilidad celular (% de VC) con el método del trifeniltetrazolio y morfometría computarizada. Los acilCoA (LCCoA) y acilcarnitina (LCCa) se extrajeron según Williamson y Corkey y después de hidrolizar se midió CoA y carnitina por método espectrofotométrico. La estadística se hizo con ANOVA de 2 factores. El PI aumentó el % de VC en ambos grupos alimenticios (AL:60,49±8,06 vs 21,26±6,61%, $p < 0,05$, n=5, AY:47,85±8,87 vs 18,21±7,99%, $p < 0,05$, n=5). Al finalizar la isquemia el contenido de LCCoA fue mayor en AY controles que en AL (46,9±3,7 vs 32,6±1,6 µmol/g, $p < 0,05$, n=6) y el contenido de LCCa fue igual en ambos grupos (1750,1±60,5 µmol/g en AY vs 1517,1±107,7 en AL, n=6). El PI no alteró los niveles de LCCoA y LCCa en ningún grupo (LCoA: 50,4±6,4 µmol/g en AY y 35,2±5,1 en AL; LCCa: 1537,73±88 µmol/g en AY y 1369,22±176 en AL). Se concluye que el PI reduce el tamaño del infarto y este efecto no se correlaciona con cambios en la acumulación de catabolitos de los ácidos grasos.

248. Efectos de la adenosina (A), fenilefrina (FE) y nitroprusiato (NP) sobre la función contráctil de bandas aisladas de ventrículo derecho de rata sometidas a hipoxia (H) y reoxigenación (R). Silvana Cerruti(1), Gustavo Testoni(1), Paula Kade(1), Enrique A. Savino(1), Alicia Varela(1)

(1)Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA - Inst. de la Química y el Metabolismo del Fármaco, CONICET

El acondicionamiento hipóxico (PC) mejora la función contráctil de bandas de ventrículo derecho sometidas a H-R, especialmente en las ratas ayunadas 24 h (AY). Los efectos podrían iniciarse por liberación endógena de agentes desencadenantes de señales intracelulares. Se estudiaron los efectos de dos agonistas, A 100 µM y FE 50 µM y de un dador de óxido nítrico, NP 1 nM en bandas de ventrículo derecho de ratas alimentadas (AL) o AY, incubadas isométricamente en Krebs-bicarbonato con glucosa 10 mM, estimulando a 1 Hz. Luego de 60 min de estabilización, se incubó 5 min con una de las drogas y después de lavar 10 min se inició una H de 30 min seguida de 60 min de R, midiéndose la fuerza desarrollada y la contractura. La estadística se hizo con ANOVA de 3 factores (con $n > 6$). En ambos grupos alimenticios la FE y el NP no afectaron la recuperación de la fuerza durante la R [a los 60 min, AL 77,6±13,4 (FE) y 69,3±5,1 (NP) vs

57,3±6,2% (controles); AY 52,8±9,7 (FE), 69,2±11,3 (NP) vs 63,4±6,6%] ni la amplitud de la contractura a los 20 min de H [AL 49,5±9,3 (FE), 55,2±9,3 (NP) vs 48,7±5,3%]; AY 67,4±13,1 (FE), 57,8±13,0 vs 57,3±6,2%]. La A no afectó la recuperación de las AL [85,3±4,0 vs 75,0±6,0% a los 60 min] pero la mejoró en AY (96,5±10,8 vs 63,4±6,7%, $P < 0,01$). La contractura no fue afectada por la A (AL 40,7±8,1 vs 48,7±5,3; AY 62,8±8,2 vs 57,3±6,1%). Los resultados indican que la A protege al miocardio hipóxico de ratas ayunadas y por ende podría participar en los mecanismos del PC.

COMUNICACIONES ORALES

ONCOLOGÍA III

249. Determinación de los antígenos asociados a tumor en el adenocarcinoma y lesiones benignas del colon. María V. Croce(1), Andrea G. Colussi(2), Esteban Adjigogovic(3), Amada Segal-Eiras(4).

(1)Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Fac. Cs. Médicas, UNLP (2)Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Fac. Cs. Médicas, UNLP. (3)Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Fac. Cs. Médicas, UNLP. (4)Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Fac. Cs. Médicas, UNLP
mailto:as-eiras@netverk.com.ar

Se estudió la expresión de los antígenos tumorales asociados al adenocarcinoma y a lesiones benignas de colon. Se emplearon anticuerpos monoclonales que reaccionan con antígenos relacionados con la diseminación tumoral: sialil Lewis x (KM93), Lewis y (C14), hapteno Tn (83D4), mucina 1 (MUC1, C595), Lewis x (KM380) y CEA (C365) y, por otra parte, antígenos expresados por la mucosa colónica normal: glicolípido colónico (C505) y el antígeno colónico normal (NCA, C198). Se incluyeron muestras de tumores de 29 pacientes con cáncer de colon y 9 pacientes con patología benigna. Mediante inmunohistoquímica se halló que los tumores malignos presentaron una elevada expresión de antígenos asociados a la diseminación tumoral: MUC1 en el 55%, sialil Lewis x, 52%, Lewis x, 61%, Lewis y, 50% y CEA 48%; en cambio, el glicolípido colónico y el NCA presentaron una menor expresión respecto a las neoplasias benignas. Los tumores malignos mostraron una reacción intensa con el KM380 así como con el C505, C198 y C365; los otros antígenos mostraron una reacción moderada. Las lesiones benignas reaccionaron principalmente con el C505 (8/9) y con el NCA (6/9); los otros antígenos se vieron expresados en un bajo porcentaje de casos. Conclusiones: el adenocarcinoma colónico expresa antígenos tumorales asociados a la diseminación tumoral y presenta una menor expresión de los antígenos de mucosa colónica normal, mayormente presentes en las lesiones benignas.

250. Efecto de estrógenos y el antiprogéstano RU - 486 en las metástasis ganglionares y pulmonares de un carcinoma mamario murino. Silvia Vanzulli(1), Alejo Efeyan(2), Claudia Lanari(2), Alfredo A. Molinolo(2).

(1)Academia Nacional de Medicina (2)Instituto de Biología y Medicina Experimental
mailto:vanzulli@hotmail.com

Habíamos demostrado que carcinomas mamarios murinos progéstano-independientes que expresan receptores de estrógenos y de progesterona regresionan con 17-beta-estradiol (E2) o con el antiprogéstano RU-486 (RU). Para estudiar la regresión tumoral de metástasis se eligió el tumor C7-2-HI, altamente metastásico. 44 hembras BALB/c fueron inoculadas y a los 40 días (tiempo suficiente para desarrollar metástasis) comenzaron los tratamientos con E2 (pellets 5mg sc, n=17), RU (0,6 mg/kg/día,

n=17), vehículo (0.6ml sc, n=10). Se evaluó el tamaño tumoral de metástasis ganglionares (MG), y en MG y en metástasis pulmonares (MP) se evaluó mitosis (NM) y apoptosis (NA) en cortes histológicos a los días 1 a 4, 7, 15 y 25. Las MG regresaron con E2 y permanecieron constantes con RU. Aumentaron las apoptosis (NA: ctrl=1.22±0.43; E2-día 25: 3.895±0.96; RU-día 25: 2.39±0.80, p<0.001). Sólo con E2 se observó citostasis (NM ctrl vs. E2-día 25: 1.99±0.32; 0.259±0.47, p<0.001). Las MG de controles y tratados fueron más diferenciadas que los tumores sc. El número de MP y el tamaño se redujeron con E2 pero no con RU: mediana(rango): control=11(7-22); E2=1(0-5); RU=12(7-22). La regresión se asoció a fibrosis, calcificación y en pulmón a acúmulos linfoides. La regresión de las MP y MG con E2 indica que estas células responden como el primario. En los tratados con RU podría suceder que la dosis no haya sido efectiva o que las células adquieran en las metástasis una sensibilidad diferencial.

251. Oligodeoxinucleótidos antisentido fosfotiolados (ASODNs) contra el receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-IR) inhiben el crecimiento de un carcinoma mamario in vivo. Mariana Salatino(1), Leticia Labriola(1), Cecilia Proietti(1), Roxana Schillaci(1), Adolfo Iribarren(2), Alfredo A. Molinolo(1), Isabel Frahm(3), Eduardo Charreau(1), Patricia Elizalde(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Instituto de Ingeniería Genética y Biotecnología (3)Servicio de Patología, Mater Dei
SALATINO@DNA.UBA.AR

Demostramos que en cultivos primarios del tumor mamario murino hormono-dependiente C4HD el bloqueo de la expresión del IGF-IR por ASODNs inhibe la proliferación mediada por Medroxioprogesterona (MPA). Estudiamos ahora el efecto de la administración in vivo de dichos ASODNs. Se inocularon tumores C4HD s.c. en ratones hembra Balb-c tratados con MPA y al alcanzar un tamaño de 15 mm³ fueron inyectados diariamente con IGF-IR ASODNs fosfotiolados en distintas condiciones. La administración i.v., usando protocolos de bajas o de altas dosis del ASODNs, resultó en una significativa disminución del crecimiento tumoral. Bajas dosis (0.25mg/día por 7 días y luego 1mg/día y 0.5mg/día alternadamente en los 7 días restantes) resultaron en un 42.6±14.3% de inhibición del volumen tumoral con respecto a los no tratados y un 50.3±11.7% con respecto a los tratados con el sense (SODNs). En altas dosis (1mg/día, 12 días) la disminución del volumen tumoral fue del 65.8±13.8% y del 67.6±11.25% respectivamente. La inyección intratumoral de los ASODNs (100mg/día, 11 días) mostró una disminución del volumen tumoral del 77.6±8.7%(ctrl) y del 66.8±22.2% (SODNs). La expresión del IGF-IR se inhibió entre un 50-80% en los tumores tratados con ASODNs, cuyos cortes histológicos presentaron aumento en la necrosis y disminución en el número de mitosis. Se concluye que el IGF-IR participa en el crecimiento tumoral mediado por progestágenos y que su inhibición in vivo por ASODNs podría ser usada terapéuticamente.

252. Rol del factor de crecimiento fibroblástico (bFGF) en la adquisición de la hormono-independencia en adenocarcinomas mamaros murinos inducidos por acetato de medroxioprogesterona (MPA). Caroline A. Lamb(1), Luisa A. Helguero(1), Alfredo A. Molinolo(1), Claudia Lanari(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental
mailto:clamb@dna.uba.ar

En experimentos previos demostramos que el receptor de progesterona estaría involucrado en la proliferación celular inducida por bFGF, sugiriendo que la adquisición de la hormono-independencia podrá estar dada por la activación de la vía del bFGF. Este factor ejerce un efecto proliferativo en cultivos primarios de células epiteliales de un carcinoma progestágeno-dependiente

(PD) (C4-HD). Comparamos la expresión de bFGF en el tumor C4-HD, obtenidos de ratones tratados o no con MPA, en variantes progestágeno-independientes (PI) y en cultivos primarios de células epiteliales y fibroblastos estromales. En extractos de membrana por Western blot obtuvimos un aumento en la expresión de la isoforma de 16.4 kDa tanto en los extractos tumorales de ratones no tratados con MPA como en células epiteliales en cultivo (Ej. tumores: intensidad relativa Sin/Con: 3.13± 0.91 p<0.05; células epiteliales en cultivo: 3.62± 1.22 p<0.05). La expresión de la proteína de 16.4 kDa fue dos veces mayor en el caso de los fibroblastos PI con respecto a los fibroblastos PD. Concluimos que la expresión y/o distribución del bFGF (16.4 kDa) se encuentra modulada por el MPA. Existe una regulación entre el epitelio y el estroma tal que la progresión a hormono-independencia podría estar asociada con un aumento en la expresión del bFGF en los fibroblastos estromales PI.

253. Estudio de p53 y MDM2 en carcinomas mamaros murinos con distinta sensibilidad a los estrógenos y antiprogestágenos. Silvia Vanzulli(1), Alejo Efeyan(2), Fernando Benavides(3), Jianjun Shen(3), Claudio Conti(3), Claudia Lanari(2), Alfredo A. Molinolo(2).

(1)Academia Nacional de Medicina (2)Instituto de Biología y Medicina Experimental (3)The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Science Park-Research Division, Smithville, T
mailto:xvanzulli@hotmail.com

Líneas de carcinomas mamaros murinos inducidos por acetato de medroxioprogesterona, de crecimiento autónomo, RE+, RP+, regresionan con estradiol (E2) o con antiprogestágenos. La regresión se asoció a incremento de p21, p27 y p53 en los tumores 59-2-HI y C7-2-HI, sensibles a ambos tratamientos y únicamente a un aumento de p27 en el tumor BET sensible sólo al E2. La falta de expresión de p21 nos indujo a estudiar en ambos tipos de tumores a) expresión de p53 y MDM2 (proteína reguladora de p53) por inmunohistoquímica, b) mutaciones de p53 por SSCP y c) funcionalidad de p53 en un sistema no relacionado a hormonas, la irradiación UVB. La expresión de p53 y MDM2 por inmunohistoquímica fue alta en tumores BET (porcentaje de número de células marcadas/número total en 10 campos de 1000x; p53=32±4.93, MDM2 = 37.03±1.79), mientras que en los tumores sensibles los niveles de p53 permanecieron bajos (C7-2-HI: 12.4±5.4; 59-2-HI: 8.6±2.5). No se detectaron mutaciones de p53 en ninguna de las líneas por SSCP. Cuando los animales portadores de las tres líneas se irradiaron con cuatro dosis de UVB (100mJ/cm²), la expresión de p53 y p21 sólo aumentó en los tumores C7-2-HI y 59-2-HI y no se modificó en tumores BET. La falta de inducción de p21 en los tumores BET podría deberse a una proteína p53 inactivada funcionalmente por MDM2. Una vía p53/MDM2 alterada podría ser un mecanismo responsable para la resistencia selectiva a hormonas.

254. La disminución de la óxido nítrico sintasa mitocondrial se halla asociada a alteraciones oxidativas en tumores murinos. Soledad Galli(1), Francisco Schopfer(1), María C. Carreras(1), Elisa D. Bal de Kier Joffé(2), Juan J. Poderoso(1).

(1)Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires (2)Instituto de Oncología Ángel Roffo, Universidad de Buenos Aires
solegalli@hotmail.com

Las mitocondrias tumorales muestran alteraciones funcionales. El óxido nítrico (NO) producido por la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) aumenta la producción de especies activas del O₂. El objetivo fue estudiar mtNOS, el estado redox y la funcionalidad de las mitocondrias de tumores murinos (M3, MM3 y P07). Se determinaron la actividad de los complejos mitocondriales (espectrofotometría) la velocidad de producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (espectrofluorometría) y la activi-

dad y expresión de la mtNOS (3HL-Cit y western blot) en dos poblaciones mitocondriales (F1 y F2). La actividad de los complejos I-III y II-III se halló disminuida (mama 276 ± 10 y 51 ± 1 ; F1: M3 127 ± 15 y 46 ± 2 ; MM3 67 ± 6 y 14 ± 1 nmol cit. c red/min.mg prot, respectivamente) y asociada a una menor producción de H₂O₂ con antimicina. Exceptuando la fracción PO7 (2), los tumores expresaron menos mtNOS: control 1, M3 0.48 (F1), 0.63 (F2), MM3 0.25 (F1), 0.31 (F2) y P07 0.44 (F1) (UA) y su actividad se halló marcadamente disminuida en todas las fracciones: mama normal 18.3; M3 5.1 (F1) y 7.7 (F2); MM3 0 (F1) y 2.2 (F2); P07 0 (F1) y 1.1 (F2) (pmol L-Cit/ min.mg prot). La producción de H₂O₂ dependiente de NO fue poco estimulada por L-Arg en las fracciones tumorales (MM3 0 (F1); MM3 0.023 (F2); M3 0.02 (F1); P07 0.017 (F1), hígado normal 0.14 ± 0.09 nmol H₂O₂ /min.mg prot). La menor producción de H₂O₂ en mitocondrias tumorales se vincula con alteraciones en la maquinaria oxidativa y la producción de NO.

255. Moduladores de la resistencia a multidroga (CsA y PSC 833) presentan diferencial capacidad de inducir apoptosis en células leucémicas murinas sensible y resistentes a Vincristina y Doxorubicina. Eloisi C. Lopes(1), Mariana G. García(1), Fernando Benavides(2), Jianjun Shen(2), Renata Luzzi(1), Elida Alvarez(1), Silvia E. Hajos(1).

(1)Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, (UBA), IDEHU-CONICET, Buenos Aires. (2)The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Science Park-Research Division. meclopes@hotmail.com

Previamente demostramos que CsA y su análogo PSC833 revirtieron el fenotipo de resistencia a multidrogas (MDR) en líneas celulares murinas resistentes a vincristina (LBR-V) y doxorubicina (LBR-D). También vimos que antineoplásicos que presentaron resistencia cruzada con vincristina o doxorubicina indujeron apoptosis solamente en línea sensible (LBR-), mostrando una correlación entre aumento de MDR y disminución de apoptosis. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de CsA y PSC833 en inducir apoptosis en este modelo tumoral, así como el mecanismo involucrado. La apoptosis se evidenció por microscopía de fluorescencia, hipoploidia celular y electroforesis en geles de agarosa y el fenotipo p53 por la técnica de SSCP. La expresión de proteínas de la familia Bcl-2 fue analizada por FACS. Demostramos que CsA (1mg/ml) indujo apoptosis en todas las líneas, independiente del fenotipo MDR en 18% (± 4) para LBR-, 26% (± 5) para LBR-V y 27% (± 4) para LBR-D, mientras que PSC833 (1mg/ml) solo indujo apoptosis LBR-V 22% (± 6). Se observó alta expresión de Bcl-2, Bax y Bcl-xL tanto en la línea sensible como resistentes, que no se modificó luego del tratamiento con CsA. No se encontraron mutaciones en los exones 5-8 de p53. Concluimos que CsA y PSC833 dependiendo de su concentración, pueden actuar tanto en la modulación de MDR como en la inducción de apoptosis. Debido a esto el mecanismo no estaría mediado por proteínas de la familia Bcl-2 ni por cambios en el fenotipo de p53.

256. Expresión y modificación de los genes mdr-1, mdr-3 y mrp, mediadores de la resistencia a multidrogas (MDR) en células de una leucemia-T murina. Mariana G. García(1), Eloisi C. Lopes(1), Elida Alvarez(1), Silvia E. Hajos(1).

(1)Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, (UBA), IDEHU-CONICET, Buenos Aires. marianag@ffyb.uba.ar

Entre los mecanismos que producen resistencia a multidrogas (MDR), uno de los más frecuentes es la sobre expresión de Pgp-170, codificada en ratón por los genes mdr-1 y mdr-3; también puede haber sobre expresión de la proteína MRP. Previamente demostramos que tanto CsA como PSC833 son capaces de revertir el fenotipo MDR en líneas murinas resistentes a Vincristina (LBR-V) y Doxorubicina (LBR-D). Este trabajo se realizó con el fin de determinar la estabilidad del fenotipo MDR así como el

mecanismo involucrado en la resistencia, a través de la expresión de mdr-1, mdr-3 y mrp en las células resistentes y sensibles. LBR-V cultivada en ausencia de vincristina (VCR) por 60 días mantuvo el fenotipo de resistencia, mientras que LBR-D cultivada durante el mismo tiempo en ausencia de doxorubicina (DOX) revirtió la resistencia. Por RT-PCR semicuantitativa se demostró que mdr-3 se sobre expresa en las líneas resistentes mientras que mdr-1 sólo lo hace en la línea LBR-V. En contraste, no hubo expresión de mrp en ninguna de las líneas. Estudios preliminares muestran en las células LBR-V una disminución de la expresión de mdr-3, pero no de mdr-1, luego del tratamiento con CsA y PSC833. En conclusión, tanto VCR como DOX indujeron resistencia a través de la sobre expresión de Pgp pero no de MRP. Aunque mdr-3 es suficiente para inducir la resistencia, la co-expresión de mdr-1 en LBR-V le conferiría una mayor estabilidad.

INMUNOLOGÍA VI

257. Los polimorfonucleares neutrófilos de pacientes con tuberculosis pulmonar activa (TB-PMN) tienen acelerada la apoptosis espontánea e inducida M:tuberculosis (Mtb). Mercedes Alemán(1), Silvia S. de la Barrera(1), Ana I. Frías(2), Federico R. Taboada(2), Eduardo Abbate(3), María C. Sasiain(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas «Mariano R. Castex», Academia Nacional de Medicina (2)Servicio de Tisiopneumología, Hospital «Francisco Muñiz». (3)Instituto «Vaccarezza», Hospital Muñiz. mailto:maleman@hematologia.anm.edu.ar

Los PMN, mediadores esenciales en la fase aguda de la TB, migran tempranamente al pulmón ejerciendo funciones efectoras contra el Mtb generando daño tisular. Anteriormente observamos que los TB-PMN se encuentran activados pudiendo contribuir al estado de inflamación sistémica durante el curso crónico de la enfermedad. Con el objetivo de analizar si la activación afecta el proceso apoptótico, se evaluó la apoptosis en PMN circulantes y su inducción en cultivo por Mtb a distintos tiempos, determinándose el % de apoptosis por expresión de Anexina V, corroborándose por microscopía y contenido de ADN así como también la expresión en membrana de CD16 y CD11b por citometría de flujo. Se estudiaron 35 pacientes y 20 normales. La apoptosis en TB-PMN frescos no difiere de los normales (N-PMN), pero aumenta espontáneamente en 3 hr de cultivo (TB: 17.1 ± 4.1 ; N: 3.5 ± 0.8) correlacionando con una mayor expresión de CD11b y pérdida del receptor CD16. Mtb indujo un marcado aumento de la apoptosis en N (12.2 ± 4.3) pero no en TB a 3 hr, coincidiendo además con una no pérdida del receptor CD16 en los TB. El efecto proapoptótico del Mtb sobre TB se observó a 18 hs de cultivo (TB: cont: 42.4 ± 13.2 , Mtb: 62.9 ± 10 ; N: cont: 38 ± 6.7 , Mtb: 37.8 ± 6.1). Conclusión: 1) TB-PMN tienen acelerada la apoptosis espontánea asociada al estado de activación. 2) Mtb tiene un efecto proapoptótico diferente sobre los TB-PMN que sería beneficioso una vez que extravasan al pulmón evitando mayor daño tisular.

258. Modelo de miocardiopatía experimental inducida por inmunización con un péptido correspondiente a receptores muscarínicos colinérgicos de tipo M2. Claudia C. Motrán(1), Hector W. Rivarola(2), Ricardo E. Fretes(3).

(1)Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas. U.N.C. (2)Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas. U.N.C. (3)Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas. U.N.C. mailto:cmotran@bioclin.fcq.unc.edu.ar

La inmunización de ratones con R13, principal epítipo de las proteínas ribosomales P de T. cruzi, induce una respuesta humoral específica reactiva con el 2do rulo extracelular de receptores muscarínicos colinérgicos de tipo M2 (V25) y B1 adrenérgicos y genera alteraciones cardíacas funcionales e histológicas. Con el

objeto de estudiar la participación de la respuesta inmune (RI) contra V25 en la generación de lesiones cardíacas este péptido fue utilizado como inmunógeno en ratones. Se caracterizó la respuesta inmune específica inducida por V25 y su rol en la patogenia en comparación con la RI contra V25 generada por la inmunización con R13. Los sueros de ratones post 4ta inmunización con V25-OVA-CFA (I) presentaron mayores niveles de IgG contra V25 que los sueros de animales inmunizados con R13-OVA-CFA (II). IgG1 e IgG2 fueron los isotipos predominantes contra V25 en sueros I y II mientras que los sueros I no presentaron reactividad contra R13. Un ensayo de ELISA competitivo demostró que los sueros I y II reconocen diferentes epítopes sobre V25. El estudio de la RI celular frente a V25 demostró la presencia de células específicas (proliferación y liberación de IL2) solo en I. Además los animales I presentaron importantes alteraciones ECG y lesiones histológicas menores en el subendocardio. Este modelo experimental puede ser válido para el estudio de los mecanismos inmunológicos que operan en patologías cardíacas de origen chagásico o no chagásico.

259. Cruzipaína induce anticuerpos que interactúan con el segundo dominio extracelular del receptor colinérgico muscarínico cardíaco M2. Laura Giordanengo(1), Susana E. Gea(1), Leonor Sterin-Borda(2).

(1)Inmunología, Dpto. Bioquímica Clínica. Facultad Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.
(2)Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires
lagiorda@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Previamente demostramos que sueros de ratones inmunizados con cruzipaína (Cz) son capaces de interactuar con receptores colinérgicos muscarínicos (RCM). Se evaluó si este efecto se debe a la interacción de IgG inmune con RCM. Dos grupos de ratones BALB/c se inyectaron i.d. con 3 dosis de: 10 µg de Cz (inmune) y ovalbúmina (control) emulsionadas en adyuvante de Freund completo. IgG inmune y control se purificaron por cromatografía. El estudio de contractilidad in vitro reveló que la IgG inmune produce una inhibición concentración dependiente (C/R) de Tensión (T) y Frecuencia (Fc) auricular: T (-68% ± 2; n=7), Fc (-26% ± 1,2; n=6) Este efecto no fue observado con IgG control y fue bloqueado por atropina (5x10⁻⁷ M) y por un péptido sintético de secuencia aminoacídica idéntica al 2do dominio extracelular del RCM M2 (péptido M2). La IgG inmune desplazó hacia la derecha la curva C/R del agonista carbacol. Se evaluó la reactividad de IgG (5x10⁻⁷ M) anti-péptido M2 por ELISA. Los resultados obtenidos (media DO ± DS) fueron con IgG inmune 3,010 ± 0,2; n=8 vs con IgG control 0,130 ± 0,03; n=8. La fracción IgG inmune purificada por afinidad con el péptido M2 fue positiva por ELISA 3,253 ± 0,2; n=5 a una concentración 10 veces menor (5x10⁻⁸ M). Esta fracción mostró actividad colinérgica muscarínica disminuyendo la contractilidad cardíaca (dF/dt -78 ± 6, n=7). En conclusión, la IgG inducida por Cz actúa sobre el RCM M2, efecto que podría conducir a la disfunción y daño del cardiomiocito

260. Asociación de antígenos bacterianos a vacunas: modulación de la respuesta inmune. Marisa Castro(1), Nancy Mateo(2), Victoria Lavigne(1), Silvana Deluchi(2), Carlos Atzori(2), María L. Brero(2), Marcela Manghi(1).

(1)Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, (CONICET/UBA) (2)Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos-ANLIS «Dr. CG Malbrán»
mailto:manghim@ffy.uba.ar

Se sabe que el estado físico del antígeno y el tipo de célula presentadora que interviene (macrófago o LB) modula a la respuesta inmune. Considerando que ciertas vacunas están compuestas por mezclas de antígenos solubles y particulados, nos interesó estudiar el efecto de diferentes asociaciones sobre la respuesta inmune contra el toxoide tetánico. Se analizó esta respuesta en ratones BALB/c inmunizados con las vacunas DT (difteria, tétanos), DTPa (con antígenos solubles de B.pertussis),

DTPw (con B.pertussis entera) o DTPaSt (con Salmonella typhi). En cultivos de células de bazo estimuladas con toxoide tetánico, se estudió la proliferación y los niveles de citoquinas, INFg, IL-12 (citoquinas pro-inflamatorias) e IL-5. La respuesta Th1/Th2 (INFg e IL-5) inducida por DTPw y DTPaSt refleja la actividad moduladora de Bp y St. Respecto a IL-12, al analizar DT vs DTPw y DTPa vs DTPaSt, sólo se observó un aumento de esta citoquina cuando Bp está presente y no así con St. Aparentemente, la presencia bacteriana induce la producción de INFg mediante distintos mecanismos. Además, nuestros resultados advierten que la incorporación de nuevos antígenos a vacunas puede modificar la respuesta original a los antígenos preexistentes. Sería beneficioso lograr inmunizar a la población contra el toxoide tetánico sin inducir una innecesaria respuesta inflamatoria, debido a que en varias oportunidades durante la vida adulta es necesario evocar la respuesta de memoria antitetánica.

261. El tratamiento con anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-factor de necrosis tumoral alfa (FNT) en la infección aguda experimental con Trypanosoma cruzi en ratones C57BL/6. Eduardo Roggero(1), Alejandro Velikovsky(2), Jeanne Wietzerbin(3), Silvia S. Revelli(1), Oscar Bottasso(1).

(1)Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario (2)IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires (3)Unite 365, Institut Curie, Paris, Francia
Bottasso@arnet.com.ar

Dado que la mayor severidad de la infección aguda experimental con T. cruzi en ratones C57BL/6 se asocia a niveles séricos más elevados de FNT, nos propusimos estudiar si el tratamiento con un AcMo específico para esta citocina podía modificar el curso de dicha tripanosomiasis. Tres grupos de ratones (n=5-8 c/u), se infectaron con 100 tripomastigotes (cepa Tulahuén) para ser inyectados vía ip a los 4, 7, 10, 14 y 17 días pi con una IgG monoclonal de rata anti-FNT de ratón, 375µg/inyección (AcMo), IgG de rata, o PBS (Co). Resultados, parasitemia (día 14 pi, mediana rango) Co 60[34-86], AcMo 244[110-346], p<0.01, tiempo de sobrevida (días, media ± es) Co 22.5±0.5, AcMo 16.4±0.5, p<0.001, FNT día 17 pi, Co 843±113, AcMo 3060.6±396, p<0.001. La involución tímica que usualmente se presenta en este modelo no fue modificada por el tratamiento con AcMo anti-FNT. El estudio histológico del corazón (día 14 pi) mostró que el grupo AcMo tenía un incremento 4 veces mayor de los nidos de amastigotes (8.2±0.3) con una reducción del 50% en el número de focos de miocarditis (3.8±0.4), respecto del Co (nidos 2.3±0.6, p<0.02; focos 7.2±1.3, p<0.05). Los resultados en los ratones que recibieron la IgG de rata no difirieron significativamente del grupo infectado sin tratar. Si bien el FNT ejerce acciones inflamatorias, su presencia es más protectora que perjudicial en este modelo de enfermedad experimental con T. cruzi.

262. El papel de los glucocorticoides (GC) endógenos en la infección aguda experimental con Trypanosoma cruzi (Tc).

Eduardo Roggero(1), Maximiliano Tamae(1), Isabel Piazzon(2), Irene Nepomnaschy(2), Adriana Del Rey(3), Hugo Besedovsky(3), Oscar Bottasso(1).

(1)Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario (2)Instituto de Leucemia Experimental, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires (3)Institute of Physiology, Medical Faculty, Marburg, Alemania
Bottasso@arnet.com.ar

La inoculación con Tc (100 parásitos) a ratones C57BL/6 y BALB/c induce una enfermedad aguda con pérdida de la corteza tímica (mayormente células doble positivas -DP-) que es letal en la cepa C57BL/6. Ambas cepas revelan niveles séricos elevados del factor de necrosis tumoral alfa (FNT), mas aún en el grupo C57BL/6. Dado que el FNT promueve la síntesis de GC se evaluaron los niveles plasmáticos de corticosterona (CT, RIA) en la infección aguda. En los ratones BALB/c (n=6) la CT comenzó a

elevarse el día 5 pi alcanzando valores máximos al día 18 pi (12.8 ± 2 $\mu\text{g/dl}$, media \pm es), mientras que en los C57BL/6 ($n=5$), el aumento de CT fue a partir del día 14 pi logrando su pico al día 18 pi (11.2 ± 1.8). El aumento relativo de CT (respecto de los valores basales en c/cepa) fue mayor en los ratones C57BL/6 comparado con BALB/c (46.7 ± 7.4 vs 22.9 ± 3.5 , en veces, $p < 0.01$). Dado los efectos inmunológicos de los GC (ej. atrofia tímica), 2 grupos de ratones C57BL/6 ($n=5$ c/u) recibieron un antagonista del receptor de GC (mifepristone 1 mg/0.1 a partir del día 2 o 10 pi). Dicho tratamiento acortó el tiempo de sobrevivencia ($p < 0.01$) incrementando aún más los niveles de TNF (día 18 pi en pg/ml, 1571 ± 383 vs 819 ± 102 del no tratado, $p < 0.03$) a la par que atenuó la involución tímica (caída de células DP, $p < 0.001$). La infección con Tc se asocia con una exagerada síntesis de GC, y una inhibición en el accionar de los mismos reduce la atrofia tímica pero acelera el curso fatal de la enfermedad.

- 263. Inmunogenicidad del factor de liberación ribosomal de Brucella melitensis y su vacuna de ADN.** Juliana Cassataro(1), Carlos A. Velikovsky(2), Raúl A. Bowden(3), Silvia Estein(3), Laura Bruno(4), Moisés Spitz(5), Carlos A. Fossati(4), Guillermo H. Giambartolomei(1).

(1)IDEHU. Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina. UBA (2)Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU) (3)Facultad de Ciencias Veterinarias, UNICEN. Tandil (4)IDEHU (5)Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina. UBA.
jucassat@ffyub.uba.ar

Se realizó un estudio para evaluar la inmunogenicidad del factor de liberación ribosomal de Brucella melitensis (BRRF). Con tal motivo se clonó el gen de BRRF, se expresó la proteína recombinante (rBRRF) en E. coli y se purificó mediante FPLC. rBRRF desencadenó reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH) en ratones infectados con B. melitensis, pero no en controles no infectados. Por lo tanto, decidimos caracterizar en ratones Balb/c la respuesta inmune generada por inmunización con rBRRF o su vacuna de ADN (pcDNABRRF). Animales inyectados con pcDNABRRF exhibieron una preponderancia de anticuerpos específicos IgG2a sobre IgG1, mientras que los inmunizados con rBRRF produjeron más IgG1 que IgG2a. Ambos protocolos de inmunización desencadenaron la producción de células T específicas productoras de INF-g. Esplenocitos de ratones inmunizados con pcDNABRRF no produjeron IL-4, IL-10 o IL-2. Las células de los ratones inmunizados con rBRRF produjeron IL-10 e IL-2, pero no IL-4. Tanto la inmunización con rBRRF como la inyección con la vacuna de ADN fueron incapaces de conferir protección contra el desafío con B. melitensis. Sin embargo, y debido a la capacidad de rBRRF de desencadenar la producción específica de IFN-g, se podría utilizar a este antígeno en un test in vitro de diagnóstico específico de la brucelosis.

- 264. Efecto de diferentes adyuvantes sobre la respuesta inmune humoral y celular inducida por la lumazina sintetasa de Brucella spp. (BLS).** Carlos A. Velikovsky(1), Raúl A. Bowden(2), Silvia Estein(2), Laura Bruno(3), Carlos A. Fossati(3), Guillermo H. Giambartolomei(4).

(1)Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU) (2)Facultad de Ciencias Veterinarias, UNICEN. Tandil (3)IDEHU (4)IDEHU. Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina. UBA
aleveli@ffyub.uba.ar

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la inmunización con una vacuna a DNA codificante de BLS induce protección en ratones Balb/c frente a un desafío con B. abortus. También observamos que la BLS induce respuesta humoral pero no desencadena respuesta inmune celular ni protección. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes adyuvantes sobre la respuesta inmune inducida por BLS. Con tal motivo ratones Balb/c se inmunizaron i.p. con BLS en ausencia o presencia

de adyuvante de Freund incompleto (AFI), Monofosforil Lípido A, (MPA) o $\text{AL}(\text{OH})_3$ (AL). La inclusión de adyuvantes durante la inmunización aumentó la respuesta humoral con predominio de IgG1 sobre IgG2a e indujo linfoproliferación. Al evaluarse el perfil de citoquinas en esplenocitos estimulados in vitro se observó que la inmunización con BLS en presencia de adyuvantes indujo una respuesta mixta Th1/Th2 donde los niveles de citoquinas variaron según el adyuvante empleado. El AFI indujo IFN e IL-10, el MPA indujo mayores niveles de IFN e IL-10, mientras que el AL indujo IFN y altos niveles de IL-10 e IL-4. Los animales inmunizados con BLS y los distintos adyuvantes alcanzaron similar grado de protección al ser desafiados con B. abortus (1.3 log de protección). Estos resultados sugieren que BLS es un candidato a ser utilizado en vacunas acelulares contra brucelosis.

REPRODUCCIÓN III

- 265. La progesterona regula la síntesis de óxido nítrico y prostaglandinas en útero de rata durante la preñez.** Mariana Farina(1), María L. Ribeiro(1), Guillermo Keller(1), Alicia B. Motta(1), Ana M. Franchi(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos marifarina@yahoo.com

La progesterona (P4), una de las principales hormonas esteroideas, es fundamental en el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Dos de los mediadores responsables de la quiescencia uterina y del inicio del parto son las prostaglandinas (PGs) y el óxido nítrico (NO). Nuestro objetivo es investigar si la P4 es capaz de modular la síntesis de PGs y NO en la preñez. La P4 sérica (cuantificada por RIA) es máxima en el día 13 y decrece hacia el día 22 de preñez. Coincidente con el pico de P4, la producción del NO uterino (por técnica de Snyder) en día 13 de preñez es máxima; mientras que las PGE2 y PGF2 α uterinas (RIA) son mínimas. En el día 22 los niveles de P4 decrecen al igual que los niveles de NO, mientras que se observa un incremento en la síntesis de PGs. El antiprogéstano RU486 administrado el día 12 de preñez (2,2 mg/rata, ip) provoca el parto prematuro dentro de las 72 hs, disminuye la P4 sérica y la producción de NO mientras aumenta la síntesis de PGs. Por otro lado el tratamiento de los animales con P4 (2 mg/rata/12hs, ip) en los días 20 y 21 de preñez retrasa 24 horas el inicio del parto, disminuyendo significativamente la producción de PGs y aumentando la de NO. Estos resultados sugieren que la P4 estaría regulando la producción de NO y PGs contribuyendo a la quiescencia uterina durante la preñez. La disminución de la síntesis de P4 permitiría el incremento de PGs necesarias para el inicio del parto.

- 266. Metabolismo lipídico del embrión en organogénesis: Alteraciones por la gesta diabética. Efectos de prostaglandina E2.** Débora Sinner(1), Matías J. Caviglia(2), Alicia Jaberbaum(1), Ariel R. Igal(2), Elida Gonzalez(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET) (2)Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (CONICET) Universidad Nacional de La Plata
mailto:deboras@sinectis.com.ar

Durante la organogénesis se requiere de niveles adecuados de lípidos de membrana y de depósito así como de prostaglandina E2 (PGE2) para el normal desarrollo del embrión. En este trabajo se evaluó el contenido y síntesis de lípidos en el embrión durante la organogénesis en la gesta diabética; el efecto de PGE2 sobre dichos niveles y proceso. Embriones controles (EC) y de ratas diabéticas (ED) por estreptozotocina (60 mg/kg ip) fueron incubados durante 3 hs con 14C-acetato, con o sin agregado de PGE2. El 14C-acetato se incorporó en acilglicéridos como ácido graso sintetizado de novo y como sustrato en la ruta de síntesis del colesterol. Las especies lipídicas se separaron por TLC y se cuantificaron por fluorescencia de DPH y radioactividad. La masa de triglicéridos (TG) se encontró aumentada en ED respecto de EC (13.9 ± 1.6 vs 7.5 ± 0.6 $\mu\text{g/mg}$ de proteínas, $p < 0.05$). La incorporación de 14C-acetato en lípidos totales disminuyó en ED (23.8

± 3.5 vs 49.8 ± 4.5 dpm/ug prot, $p < 0.05$) comparado con EC, revirtiéndose parcialmente por PGE2 (37.7 ± 4.4 , $p < 0.05$ vs ED). En ambos grupos el 14C-acetato se incorporó predominantemente en fosfatidilcolina (60%), fosfatidiletanolamina (7%), TAG (15%), ésteres de colesterol (5%) y colesterol (3%). Concluimos que a) los niveles de TG están incrementados en ED b) la síntesis endógena de lípidos es un proceso activo en el embrión durante la organogénesis pero se encuentra disminuido en ED, logrando revertirse esta situación por la adición de PGE2.

267. Mecanismos de regulación génica de estrógenos y progesterona en la proliferación y diferenciación de células de endometrio. Griselda Vallejo(1), Mónica Fazzini(1), Lino S. Barañao(1), Miguel Beato(2), Patricia Saragüeta(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales U.B.A (2)Centro de Regulación Genómica-Universidad Pompeu Fabra. mailto:

El objetivo de nuestro trabajo es estudiar los mecanismos de acción de hormonas ováricas sobre la proliferación y diferenciación de células de endometrio como prerrequisito para la implantación del blastocisto. Se determinaron las condiciones de cultivo para la línea estromal de endometrio de rata U118 en presencia de estrógenos y progesterona. La concentración de suero en el medio de cultivo es decisiva para determinar la respuesta celular hacia diferenciación o proliferación. Tratamientos con EGF (100ng/ml) o progesterona (10-6M) y estradiol (10-8M) producen la diferenciación de las células medida por RT-PCR semicuantitativa para desmina (EGF: 3.2 ± 0.9 , P4+E2: 3.3 ± 0.9 veces mRNA desmina/control) y prolactina (P4+E2: 1.9 ± 0.1 veces mRNA prolactina/control). Mientras la progesterona (10-6M) (1.5 ± 0.1 veces de nro cel/control) y el FBS 10% (2.42 ± 0.48 veces de nro cel/control) activan la cascada mitogénica. La proliferación inducida por progesterona fue inhibida por un inhibidor específico de ERK1-2 (0.8 ± 0.1 veces de nro cel/control) al igual que por un antagonista del receptor de estradiol (0.81 ± 0.01 veces de nro cel/control). Estos resultados sugieren que el efecto proliferativo de la progesterona estaría mediado por la cascada de MAPK y que el receptor de esteroides participaría en la señalización. También, muestran la utilidad de las células endometriales U118 como modelo para estudiar la diferenciación y proliferación decidua inducidas por hormonas asociadas a la implantación.

268. La presencia de catecolestrógenos durante la maduración in vitro de ovocitos bovinos inhibe su posterior desarrollo. Mariano L. Lattanzi(1), Claudio B. Santos(1), Lino S. Barañao(2).

(1)Intitudo de Biología y Medicina Experimental-CONICET (2)Intitudo de Biología y Medicina Experimental-CONICET. Facultad de Cs.Exactas y Naturales-UBA lattanzi@dna.uba.ar

Los catecolestrógenos son metabolitos endógenos que modulan la actividad de las células de la granulosa, tecales, y luteales en algunas especies. El objetivo fue determinar el posible rol de estos esteroides en la maduración de los ovocitos bovinos. Los ovocitos fueron madurados por 25 hs en TCM 199 + 5% FBS y oFSH. Luego fueron fertilizados y cultivados por 8 días. Mientras que estradiol no produjo efectos, el agregado de 1 ug/ml del catecolestrógeno 2-metoxiestradiol (2-ME) durante la maduración in vitro no afectó el clivaje, pero disminuyó significativamente el porcentaje de blastocistos al día 8: Control: $37.8\% \pm 2.1\%$, $n=346$ ovocitos; 2-ME: $2.1\% \pm 3\%$, $n=246$. Este efecto fue menos marcado cuando el 2-ME fue agregado durante el cultivo: Control: $45.5\% \pm 12.6\%$; $n=131$; 2-ME: $16.5\% \pm 1.9\%$; $n=93$. Basándonos en la demostración de la inhibición específica de la superóxido dismutasa por 2-ME, diferentes antioxidantes fueron testeados pero ninguno de ellos fue capaz de revertir el efecto producido por 2-ME. Habiéndose demostrado que 2-ME puede afectar la polimerización de la tubulina se realizó una técnica inmunocito-

química que permitió observar una marcada alteración del huso meiótico y una distribución anormal de los cromosomas en la metafase II de los ovocitos madurados en presencia de 2-ME. Estos resultados demuestran que, sumado a sus acciones intraováricas ya demostradas, los catecolestrógenos pueden afectar la capacidad de desarrollo de los ovocitos mamíferos.

269. Efecto del tratamiento con agonistas (GnRHa) y antagonistas de GnRH (GnRHant) sobre la proliferación y la apoptosis de las células endometriales de pacientes con endometriosis (EDT). Mariela A. Bilotas(1), Gabriela F. Meresman(1), Rosa I. Barañao(1), Carlos Sueldo(2), Ricardo A. Buquet(3), Marta Tesone(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) (2)Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER) (3)Hospital de Clínicas, UBA. mailto:meresman@dna.uba.ar

La terapéutica médica utilizada para tratar la EDT incluye a los GnRHa y GnRHant. En estudios previos observamos niveles de apoptosis (AP) disminuidos y de proliferación celular (PC) aumentados en el endometrio eutópico de pacientes con EDT. Con el fin de investigar una posible acción moduladora de los GnRHa y GnRHant sobre el crecimiento endometrial, se realizaron cultivos de cél. epiteliales a partir de biopsias de endometrio de 30 mujeres (16 con EDT y 14 controles) y se estimularon con TGF β , Acetato de Leuprolide (LA) y Antide (Ant). Se evaluó PC por incorporación de 3H-Timidina y AP por doble tinción con Naranja de Acridina y EtBr. El TGF β indujo una respuesta bifásica de la PC: 0.01ng/ml: 58.3 ± 44 ; 0.1ng/ml: 67.3 ± 24.8 , 1ng/ml: 71 ± 26.0 y 10ng/ml: -40.2 ± 7.8 (%estimulación sobre el basal, $p < 0.05$, 0.01 y 0.01 respectiv. vs 10ng/ml). El Ant, y el LA a distintas dosis inhibieron la PC del cultivo estimulado con TGF β : LA 1ng/ml, -29.0 ± 25.0 ; 10ng/ml, -61.6 ± 8.1 y 100ng/ml, -62.6 ± 20.6 y Ant, 10-7M, -59.0 ± 28.3 ($p < 0.05$, 0.01, 0.001 y 0.001, respectiv. vs TGF β 0.1ng/ml). El LA 100ng/ml y el Ant 10-7M incrementaron el índice de AP: 40.1 ± 11.4 ($p < 0.01$) y 37.5 ± 16.6 ($p < 0.05$) respectiv. vs 22.1 ± 7.8 (%cél. apoptóticas) en el basal. El agregado de LA 100 ng/ml, luego del estímulo con Ant 10-7M, indujo valores de AP similares a los observados en el basal (29.9 ± 5.8 , ns). En conclusión los GnRHa y GnRHant modularían el crecimiento endometrial aumentando los niveles de AP y disminuyendo la PC.

270. Efecto de un agonista de GnRH sobre la esteroidogénesis ovárica en ratas prepúberes superovuladas. Griselda Iruستا(1), Fernanda Parborell(2), Silvia I. Gonzalez-Calvar(3), Douglas M. Stocco(4), Ricardo S. Calandra(2), Marta Tesone(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA (2)Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Fac. Ciencias Exactas y Naturales, UNLP (3)Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET (4)Department of Cell Biology and Biochemistry, Texas Tech University Health Sciences Center mailto:girusta@yahoo.com

Los análogos de GnRH ejercen un efecto directo sobre el ovario. En nuestro laboratorio hemos demostrado una inhibición del crecimiento folicular asociado a un aumento de la apoptosis ovárica (Mol Repr Dev 51, 287-294 1998; Mol Repr Dev, en prensa). En este trabajo se estudió en ratas prepúberes superovuladas, el efecto de la administración de un análogo de GnRH (Acetato de leuprolide (LA) 1 ug/rata/ 2 días) sobre la expresión de proteínas esteroidogénicas y el metabolismo de esteroides sexuales en folículos ováricos preovulatorios (FPO). Los FPO de ratas tratadas con LA muestran (westernblot), un aumento significativo en el contenido de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR) (63%), mientras que no variaron los niveles del citocromo P450scc. En suero, los niveles de estradiol (E) disminuyeron significativamente (C: 531 ± 52 , LA: 141 ± 27 pg/ml),

sin cambios en la progesterona (P). El contenido de P tisular aumentó significativamente en el grupo LA (C:65±2, LA: 304±53 pg/folículo), así como su metabolito inactivo, la 20α-hidroxi-P (C:89±24, LA:363±43 pg/folículo). En cambio los andrógenos se vieron significativamente disminuidos (Testosterona=C:1.5±0.1, LA:0.3±0.06 ng/ml suero; C:20.8±4.4, LA:4.4±1.2 pg/folículo; Androsterona=C:915±414.4, LA:334±31 pg/folículo). Se concluye que el efecto inhibitorio de LA sobre el desarrollo folicular estaría en parte mediado por cambios en la expresión de la StAR y en la producción de esteroides ováricos.

271. Estudios moleculares del gen del receptor de FSH (FSHR) en pacientes con síndrome de ovario resistente (ROS) y falla ovárica prematura (POF). Victoria Sundblad(1), Violeta A. Chiauzzi(1), Liliana Dain(2), Eduardo Charreau(3).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET (2)Centro Nacional de Genética Médica (ANLIS) (3)Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA
sundblad@dna.uba.ar

Se han descrito mutaciones y/o secuencias polimórficas en el gen del receptor de FSH (FSHR) en mujeres afectadas con POF y/o ROS. En un estudio previo informamos que tanto la mutación inactivante C566T como las alteraciones en el exón 1 de este gen no estarían involucradas en la etiopatología de POF y ROS en nuestra población. En el presente trabajo ampliamos el estudio a la búsqueda de mutaciones en los exones 2, 3, 4, 5 y 10 del gen del FSHR. Se analizaron muestras de ADN provenientes de 6 pacientes ROS, 13 POF y 43 controles. Las regiones de interés fueron amplificadas mediante PCR y los exones 2 al 5 analizados por SSCP. En ningún caso se observaron patrones de migración anormales al comparar las pacientes POF y/o ROS con los controles. El exón 10 se amplificó en tres fragmentos: 10A, 10B, 10C. El fragmento 10A correspondiente a las muestras de ROS, POF y de 5 controles fue analizado mediante secuenciación directa. El análisis evidenció la presencia del polimorfismo A919G, el cual fue estudiado en el resto de la población control por digestión con la enzima Ahd I. Las frecuencias alélicas halladas fueron: población control: 55,8% A y 44,2% G; POF: 57,7% A, 42,3% G y ROS: 50% A y 50% G. Por otro lado, se halló un cambio T1022C (Val341Ala) en heterocigosis en una muestra control. Concluimos que los exones 2 al 5, así como el polimorfismo A919G, no estarían involucrados en la etiopatología de ambas enfermedades en las pacientes estudiadas.

272. Posible participación de IL-6, su receptor gp80 y mastocitos en la inducción de aborto en ratones CBA/J x DBA/2J. Sandra M. Blois(1), Ana C. Zenclussen(2), Teresa Gentile(1), María E. Roux(1), Ileana Malan Borel(3), Ricardo A. Margni(1).

(1)IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (2)Charité, Universidad de Humboldt, Berlin, Alemania (3)Universidad Nacional del Litoral, Sta. Fe
mailto:sblois@ffy.uba.ar

En el aborto murino existe un incremento de células inmunocompetentes (natural killer, macrófagos, citotóxicas) a nivel placentario y un aumento de citoquinas Th1 a nivel local y sistémico. El rol que juega la IL-6 en esta patología todavía es incierto. En el presente estudio investigamos la presencia de mastocitos (productores de IL-6 entre otras), de IL-6 y de su receptor tisular gp80 en placenta y decidua de ratones CBA/J x Balb/c (cruza normal) y CBA/J x DBA/2J (alta tasa de resorción fetal). En los tejidos procesados por la técnica de Saint Marie, se determinó el número de mastocitos por coloración Alcian Blue-Safranina y la presencia de IL-6 y gp80 por IFI. Durante el período de gestación se evaluaron los niveles séricos de IL-6 por ELISA. En el período final de la gestación encontramos niveles séricos aumentados de IL-6 en la crua abortadora en comparación con la crua normal. La IL-6 y gp80 se expresan en células de decidua y trofoblastos. Mediante análisis semicuantitativo ob-

servamos aumento en el número de células IL-6+ en placenta de abortos, especialmente en trofoblastos que rodean vasos fetales p<0.01. En la crua abortadora los mastocitos de decidua están aumentados en comparación con la crua normal p<0.001. Es de interés el hallazgo de un aumento en el número de mastocitos (no degranulados) y células IL-6+ en el tejido de resorción, estos resultados sugerirían que éstas células productoras de IL-6 podrían estar involucradas en el aborto espontáneo.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES II

273. Inhibición de flujos de calcio por 2APB en plaquetas humanas. Oscar A. Gende(1).

(1)Centro de Investigaciones Cardiovasculares
mailto:ogende@atlas.med.unlp.edu.ar

Cuando se vacían los depósitos intracelulares de calcio (por ejemplo con taspigargina, un inhibidor de la bomba del retículo endoplásmico) se produce la entrada capacitativa de calcio extracelular. La falta de herramientas farmacológicas dificulta la identificación de las señales que relacionan ambos fenómenos. El 2APB es un compuesto permeante que ha sido propuesto como inhibidor selectivo de receptores de trifosfato de inositol (IP3Rs). En este resumen se utiliza 2APB 0.1 mM para mostrar la participación de los IP3Rs en la movilización y en la entrada capacitativa de calcio en plaquetas humanas cargadas con el indicador fluorescente FURA 2. ADP 0.005 mM produce un pico en la concentración de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i) de 88 ± 31 nM que se reduce a 16.4 ± 6 nM con 2APB (P<0.05). La incorporación de calcio extracelular 1mM en plaquetas preincubadas 5 min. con taspigargina 0.001 mM produce un aumento de [Ca²⁺]_i a una velocidad de 8.7 ± 2 nM/seg que se reduce a 0.9 ± 0.4 nM/seg con 2APB (P<0.05). El tratamiento con taspigargina produce el ingreso de Mn²⁺ apagando la fluorescencia del FURA 2 a una velocidad de 336 ± 70 mientras que el 2APB la reduce a 45 ± 25 (unidades arbitrarias, P<0.05). Aunque la selectividad del 2APB no es muy alta, estos resultados proveen nueva evidencia de que los IP3Rs están involucrados en la activación por taspigargina de la entrada capacitativa de calcio en las plaquetas humanas.

274. Indiana Clock y las señales del reloj circadiano. Gabriela A. Ferreyra(1), Patricia V. Agostino(1), María F. Rubio(1), Diego A. Golombek(1).

(1)Universidad Nacional de Quilmes
mailto:gferrey@unq.edu.ar

Los ritmos circadianos se sincronizan por la acción de la luz sobre los núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Y nosotros seguimos buscando las señales neuroquímicas que median la sincronización del hámster, que comienza con la interacción retino-NSQ mediada por glutamato/Ca²⁺. Hallamos variaciones diarias en la actividad de la quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina (CaMK-II) en los NSQ (con un máximo diurno), sin cambios en el nivel total de CaMK. Pulsos de luz bajo oscuridad constante (al comienzo y al final de la noche) produjeron aumentos transientes (5-60 min) en los niveles de p-CaMK. Río abajo, los niveles de fosforilación de NOS por CaMKII mostraron una correlación temporal en el aumento de la actividad de la quinasa, en una vía que puede estar relacionada a las señalizaciones del GMPc en el reloj. En los NSQ también hallamos la hemo-oxigenasa 2 (HO-2) en forma constitutiva, que presentó un máximo de actividad durante la noche (L:O) o noche subjetiva (O:O), en forma independiente del control fótico. Estos resultados sugieren que la sincronización fótica de los ritmos circadianos incluye una vía CaMK->NOS/HO->GMPc su ruta.

275. Activación del Receptor de Progesterona(PR) por Heregulina(HRG) y Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos(MAPK) en células de carcinoma mamario humanoT47D. Leticia Labriola(1), Mariana Salatino(1), Cecilia Proietti(1), Omar A. Coso(2), Adalí Pecci(2), Eduardo Charreau(1), Patricia Elizalde(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental. (2)Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.UBA
mailto:labriola@dna.uba.ar

El tratamiento de células T47D con HRG indujo tanto la 'down-regulation' del PR como la disminución de la cantidad de sitios de unión (control: 939± 298 fmol/mg proteína, HRG:198±128.6fmol/mg proteína, Acetato de Medroxiprogesterona(MPA):203.2± 58.9fmol/mg proteína). HRG produjo un aumento ($p<0.01$) del porcentaje de PR localizado en el núcleo (control:23.6±11.4%, HRG:83.3 ±5.8%, MPA:88.8 ±3.1 %). Ensayos de 'DNA mobility shift' demostraron que HRG induce la unión específica del PR a un PRE y que ésta se ve inhibida por el pretratamiento tanto con PD98059, inhibidor de MEK-1, como con oligodeoxinucleótidos antisentido de ErbB-2 (ASODN ErbB-2). En transfecciones transientes de células T47D con un vector conteniendo un PRE fusionado al gen de la cloranfenicol acetil transferasa(CAT) se observó que HRG aumentó ($p<0.01$) la actividad de CAT. Esta activación transcripcional del PR fue inhibida por el pretratamiento con ASODN ErbB-2, PD 98059 o RU486.(Control:26.6±2.9 %, MPA:100%, HRG:79.2±3.2%, HRG+ASODN ErbB-2:33.9 ±3.1%, HRG+SODN ErbB-2:65.7 ±3.7%, HRG+PD98059:25.2±4.5%, HRG+RU486:42.6±4.2%). Ensayos de fosforilación in vitro mostraron que MAPK aisladas de células tratadas con HRG, fueron capaces de fosforilar al PR. MAPK inmunoprecipitadas de células que habían sido pretratadas con PD98059 inhibieron este efecto. Estos resultados demuestran que HRG es capaz de transactivar al PR y proporcionan la primera evidencia de que MAPK tienen la capacidad de fosforilarlo in vitro.

- 276. Heregulina (HRG) inhibe la proliferación de células de cáncer de mama vía la activación de ERKs y fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K) pero regula el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA).** Cecilia Proietti(1), Lydia I. Puricelli(2), Leticia Labriola(1), Mariana Salatino(1), María E. Balañá(1), Julio Aguirre Ghiso(2), Romina P. Carnevale(1), Omar P. Pignataro(1), Eduardo Charreau(1), Elisa D. Bal de Kier Joffé(2), Patricia Elizalde(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Instituto de Oncología «Angel H. Roffo»
mailto:proietti@dna.uba.ar

Investigamos la expresión de HRG y de los receptores ErbBs en la línea de cáncer de mama metastásica LM3. Las células LM3 no expresan HRG y muestran niveles elevados de ErbB-2 y ErbB-3 y moderados de ErbB-4. El tratamiento con HRG de LM3 resulta en la inhibición de la proliferación (ensayo de incorporación de $[^3H]$ timidina, control: 61046cpm ±2300; HRG (10 ng/ml):29069cpm ±3400) y de la migración. HRG también inhibe la actividad de uPA y de la metaloproteasa 9 (MMP-9). HRG induce la fosforilación en tirosina de ErbB-2, ErbB-3 y ErbB-4 y la formación de heterodímeros ErbB-2/ErbB-3 y ErbB-2/ErbB-4. El agregado de HRG a LM3 resulta en la rápida activación de la PI-3K y en la asociación de la subunidad p85 de PI-3K con ErbB-3. HRG también causa una rápida activación de MAPK (ERK1 y ERK2) y de Stat3 y Stat5 (proteínas transductoras de señales y activadoras de transcripción, STATs). El bloqueo de la actividad de PI-3K usando su inhibidor químico wortmanina(500nM) o de la actividad de MEK1/ERKs usando PD98059 (10uM) resulta en bloqueo total de la capacidad de HRG de inhibir la proliferación. Sin embargo, la inhibición de esos dos caminos de transducción no afecta la regulación de la actividad de uPA inducida por HRG. Nuestros resultados demuestran por primera vez la activación de STATs por HRG en células de cáncer de mama e indican que los caminos de señalización mediante los cuales HRG regula proliferación serían distintos de aquellos por los cuales inhibe la activación de uPA.

- 277. Vías de señalización del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1) en la activación de linfocitos T humanos.** Roxana Schillaci(1), Mariana G. Brocardo(2), Tomas A. Santa Coloma(2), Alicia Roldan(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar
mailto:rschilla@dna.uba.ar

En nuestro laboratorio se demostró que en linfocitos T (LT) después de 15 min de activación la expresión del receptor de IGF-1 (IGF-1R) disminuye, proceso que se acelera en presencia de IGF-1. Con el objeto de comprobar si esta disminución se debe a una activación con posterior internalización del mismo, se decidió estudiar la fosforilación del IGF-1R, la activación de las MAPKs, ERK-1 y 2, y la activación del IRS-1 a través de su asociación con la PI3K. Para ello se utilizaron LT purificados de sangre humana estimulados con PHA y células de la línea Jurkat estimuladas con PHA+PMA, en presencia o no de IGF-1. Después de 5 min de activación las células se lisaron y las proteínas se analizaron por Western Blot o previamente se sometieron a inmunoprecipitación. Los resultados demostraron que la presencia de IGF-1 aumentó 59 ± 7 % la fosforilación de las ERK1 y 2 en LT; pero no indujo cambio en las Jurkat. Además, aunque no se pudo detectar IRS-1 inmunoprecipitado en los LT, sí fue posible en las Jurkat pero sin estar asociado a la PI3K. Finalmente la inmunoprecipitación con anticuerpo contra IGF-1R mostró una banda fosforilada de 98 kDa (subunidad beta del IGF-1R) solo en LT estimulados en presencia de IGF-1. Los resultados demuestran que en la activación de LT el IGF-1 induce la fosforilación de su receptor y aumenta la fosforilación de las ERK1 y 2, no pudiéndose demostrar la activación del IRS-1, lo que sugiere que la vía de las MAPKs es más activa que la del IRS-1.

- 278. El sustrato de quinasa C miristoilado rico en alanina (MARCKS) se expresa en membrana plasmática de hepatocitos y el forbol 12-acetato 13-miristato (PMA) induce su translocación a lisosomas.** María C. Larocca(1), Elena J. Ochoa(1), Arlinet Kierbel(1), Sergio A. Grdilone(1), Fabiana García(1), Raúl A. Marinelli(1).

(1)Instituto de Fisiología Experimental (IFISE - CONICET)
mailto:mlarocca@fbioyf.unr.edu.ar

MARCKS es un sustrato de proteína-quinasa C (PKC) que actúa como mediador en vías de señalización en las que interviene esta quinasa. Estudios en fibroblastos sugieren que MARCKS tendría un rol en la modulación de la función lisosomal. Previamente demostramos que PKC inhibe la degradación lisosomal de proteínas en hepatocitos, y que el mecanismo involucra un mediador intracelular aún no identificado. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de MARCKS en hepatocitos y analizar la posibilidad que medie esta vía regulatoria. Se incubaron hepatocitos con el activador de PKC PMA 1 uM, o su vehículo (control), en condiciones en que PMA, vía PKC, inhibe la proteólisis lisosomal. Para analizar la fosforilación de proteínas se agregó ^{32}P -ortofosfato al medio. La expresión de MARCKS se analizó en lisado de hepatocitos y en fracciones enriquecidas en lisosomas (L) o en membranas plasmáticas (MP) por inmunoprecipitación e inmunoblotting, y la fosforilación de proteínas, por autorradiografía. Resultados: MARCKS (81 kDa) se expresa en hepatocitos y la activación de PKC con PMA induce su fosforilación. En estas condiciones hay una disminución en los niveles de MARCKS en MP (-36±10 % $p<0,05$ $n=3$) simultáneo a un aumento en L (+21±5 % $p<0,05$ $n=3$). Conclusión: estos datos sugieren que PKC fosforila MARCKS en hepatocitos induciendo su translocación a lisosomas, lo que permite especular sobre su intervención como mediador en la modulación de la proteólisis lisosomal por PKC.

- 279. Modulación de la actividad de serina/treonina fosfatasa en la estimulación hormonal de la esteroidogénesis en células de Leydig de la línea MA-10.** Cecilia Poderoso(1), Alejandra B. Gorostizaga(1), Fabiana Cornejo Maciel(1), Cristina Paz(1), Ernesto J. Podestá(1).

(1)Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA
mailto:gacela66@hotmail.com

Previamente demostramos que el grado de fosforilación de proteínas en tirosina en células esteroideogénicas es dependiente de la acción hormonal mediante la modulación de la actividad de proteína tirosina fosfatasas. El objetivo de este trabajo fue analizar la actividad diferencial de dos serina/treonina fosfatasas PP1 y PP2A durante la estimulación aguda de la esteroideogénesis (5-60 min) por AMPc en células de Leydig de la línea MA-10. La actividad enzimática de PP1 y PP2A expresada como nmoles de fosfato liberados/min.mg de proteína fue discriminada mediante la utilización de ácido okadaico, un inhibidor con mayor IC50 para PP1 que para PP2A. El 8BrAMPc no modificó la actividad de PP1 (Control: 5 min: $1,23 \pm 0,02$; 15 min: $1,25 \pm 0,03$; 30 min: $1,30 \pm 0,05$; 60 min: $1,28 \pm 0,07$; 8BrAMPc: 5 min: $1,53 \pm 0,19$; 15 min: $1,61 \pm 0,52$; 30 min: $1,56 \pm 0,24$; 60 min: $1,59 \pm 0,07$). En cambio, la actividad de PP2A disminuyó a tiempos cortos de estimulación respecto del control (5 y 15 min) y luego (30 y 60 min) se normalizó: control: 5 min: $2,67 \pm 0,14$; 15 min: $2,8 \pm 0,1$; 30 min: $2,4 \pm 0,1$; 60 min: $2,59 \pm 0,09$; 8BrAMPc: 5 min: $1,4 \pm 0,6$ ($P < 0,01$); 15 min: $1,77 \pm 0,52$ ($P < 0,05$); 30 min: $2,01 \pm 0,29$; 60 min: $3,1 \pm 0,3$). La inmunoprecipitación de la PP2A y posterior Western-blot reveló la presencia de fosfoserina y ausencia de fosfotirosina. Los resultados sugieren que en células de Leydig además de la estimulación de tirosina fosfatasas existe una modulación de la actividad de PP2A vía PKA.

280. Participación de acil-CoA tioesterasas y araquidonil-CoA sintetetas en la regulación de la esteroideogénesis y liberación de ácido araquidónico. Paula Maloberti(1), Pablo Mele(1), Paula Bey(1), Florencia Cano(1), Rocío Castilla(1), Fabiana Cornejo Maciel(1), Ernesto J. Podestá(1).

(1)Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.
maloberti@fmed.uba.ar

El ácido araquidónico (AA) juega un rol obligatorio en la regulación de la esteroideogénesis. Estas conclusiones están basadas en que inhibidores de la PLA2 inhiben este proceso. Previamente caracterizamos y clonamos una acil-CoA tioesterasa involucrada en la regulación de la esteroideogénesis capaz de liberar AA. El objetivo del presente trabajo es demostrar el rol de araquidonil-CoA sintetetas y acil-CoA tioesterasas en la regulación de la esteroideogénesis. Los compuestos ácido nordihidroguayaretico (NDGA) (50uM), bromuro de p-bromofenacilo (100uM) y araquidonil-trifluorometil-cetona (100uM), inhibidores de la PLA2, reducen un 100, 75 y 65% la actividad in vitro de la tioesterasa respectivamente. Triacsin C, inhibidor de la enzima araquidonil-CoA sintetasa, inhibe la esteroideogénesis. La incubación de células Y1 en presencia de dosis submáximas de Triacsin C (0,5uM) y NDGA (5uM) produce un efecto sinérgico de un 93% de inhibición en la síntesis de esteroides, mientras que las mismas dosis individualmente producen una inhibición del 21% y 69% respectivamente. La localización subcelular de acil-CoA tioesterasas (citósolica y mitocondrial) fue estudiada a través de la expresión en células esteroideogénicas de las enzimas fusionadas a la proteína GFP y Western blot, observándose una distribución diferencial de acuerdo con la proteína utilizada. La acción concertada de acil-CoA tioesterasa y sintetasa constituiría un mecanismo de liberación de AA y su compartimentalización.

INTERDISCIPLINARIA

281. Canales iónicos en células leucémicas. Relación con las proteínas CFTR y MDR. Yanina A. Assef(1), Alicia Damiano(2), Elsa Zotta(2), Cristina Ibarra(2), Basilio A. Kotsias(1).

(1)Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires (2)Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires
mailto:assef_y@ciudad.com.ar

Utilizamos la línea celular K562, derivada de una leucemia mieloide crónica humana para el estudio de los canales iónicos medidos con técnicas de patch clamp. Nuestros objetivos fueron describir los movimientos iónicos, evaluar la expresión de proteínas integrales de membrana como el regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y multidroga resistencia (MDR), comprobar si su distribución es complementaria y establecer la relación entre estas proteínas y su posible funcionalidad. Por RT-PCR se obtuvieron dos bandas de 300 pb y 170 pb correspondientes a la zona amplificada de CFTR y MDR1. Por inmunohistoquímica ambas proteínas se hallaron en la membrana celular. La forskolina, una droga que actúa sobre la adenilato ciclasa, activa canales aniónicos que tienen una relación lineal entre corriente y voltaje, potencial de reversión de 0 mV y una amplitud de 0.91 pA (0.14,SD) a 80 mV y -0.96 pA (0.22,SD) a -80 mV, lo que indica una conductancia de 12 pS, parámetros que no se alteran en ausencia de Na. Los canales tienen menor permeabilidad (P) al gluconato y al F, con valores de P_{Gluconato}/P_{Cl} y P_F/P_{Cl} de 0.24 y 0.20, respectivamente (n=5). La presencia de este canal con una conductancia similar al del CFTR sin rectificación e inhibible por glibenclamida nos hace pensar que la proteína hallada por técnicas de biología molecular podría tener una expresión funcional en las células K562 y que no es complementaria al MDR como ha sido postulado en otros tipos celulares.

282. v-Ras, v-Raf y v-Src promueven la sobrevivencia celular vía RalA en fibroblastos NIH3T3. Alejandro P. Adam(1), Julio Aguirre Ghiso(1), Lydia I. Puricelli(1), Elisa D. Bal de Kier Joffé(1).

(1)Area Investigación. Instituto de Oncología A. H. Roffo. Universidad de Buenos Aires.
aleadam@fmed.uba.ar

El conocimiento de las vías de transducción que regulan la sobrevivencia celular es de suma importancia para la generación de nuevas terapias oncológicas. Estudiamos si RalA, una GTPasa de la familia Ras, es necesaria para la sobrevivencia en células NIH3T3 transformadas con v-Ras, v-Raf ó v-Src, mediante la co-expresión de una dominante negativa de RalA, S28N-RalA. Observamos que estos oncogenes permitieron al 100% de éstas células sobrevivir en suspensión, en tanto que la co-expresión de S28N-RalA elimina esta capacidad. El tratamiento de células NIH3T3-Neo con cisplatino 0,1mM o privación de suero por 24h indujo apoptosis en el 80% de las células, según tinción con naranja de acridina, mientras que la apoptosis en NIH3T3-v-Ras, -v-Raf y -v-Src fue menor al 20% ($p < 0,05$ vs Neo). En cambio, la co-expresión de S28N-RalA indujo apoptosis superior al 50% en todos los casos ($p < 0,05$ vs control). La inhibición de PI3K (100nM wortmannina) sinergizó con S28N-RalA en NIH3T3-v-Ras, mientras que la inhibición de MEK (50uM PD96059) sinergizó en NIH3T3-v-Raf en ensayos de privación de suero. En las células NIH3T3-v-Raf, el ac. fosfatídico restituyó la capacidad de sobrevivencia. La expresión de S28N-RalA no modificó el nivel de fosforilación de MEK o JNK, pero aumentó la fosforilación de p38. Estos resultados sugieren que RalA es necesaria, junto a PI3K ó MEK, para la actividad antiapoptótica de los oncogenes v-Ras, v-Raf y v-Src, posiblemente a través de la modulación de la actividad de PLD1 y Rho.

283. Impacto del sistema angiotensinergico en la diferenciación de monocitos y precursores mieloides a células dendríticas. Karen Nahmod(1), Mónica Vermeulen(1), Silvina Raiden(1), Gabriela Salamone(1), Paula Fernandez(1), Víctor Nahmod(2), Mirta Giordano(1), Jorge Geffner(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina (2)Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari. UBA.
mailto:knahmod100@hotmail.com

Estudiamos la participación del sistema angiotensinérgico en la diferenciación de células dendríticas (cd). Monocitos humanos cultivados 7 días con GM-CSF + IL-4 adquieren el perfil fenotípico de cd. En presencia de candesartán (CA, 10 ug/ml), antagonista de los receptores AT1 para angiotensina II (All), las células no adquieren este perfil y muestran: a) bajos niveles de CD1a (intensidad media de fluorescencia = 1936 ± 146 vs 322 ± 83 , controles vs CA, $n=18$, $p < 0.001$) y una capacidad limitada para inducir la reacción de cultivo mixto linfocitario (CML): 26318 ± 4087 vs 7106 ± 2044 cpm, controles vs CA, $n=7$, $p < 0.001$. Por el contrario, la All (1nM) medió un incremento significativo ($p < 0.001$) en la expresión de CD1a y en la reacción de CML. En cultivos de médula ósea de ratones Balb/c, diferenciados a cd por tratamiento con GM-CSF por 10 días, encontramos que aquellas células cultivadas con losartán (50 ug/ml) mostraron una menor capacidad para inducir in vivo una respuesta humoral, luego de ser pulsadas con ovalbúmina (50 ug/ml) in vitro y transferidas a ratones Balb/c, mientras que la All (1nM) medió un efecto exacerbador: niveles de anticuerpos IgG + IgM anti-OA cuantificados por ELISA en unidades de absorbancia: 0.52 ± 0.12 vs 0.11 ± 0.08 vs 1.20 ± 0.10 , controles vs LOS vs All, $n=7$, $p < 0.001$ controles vs LOS y controles vs All. Los resultados presentados sugieren que el sistema angiotensinérgico afecta la diferenciación de precursores mieloides a cd.

284 . Desarrollo de un modelo hiperleptinémico en la rata: implicancias sobre la función adrenal.. Mario Perelló(1), Andrea Chisari(1), Eduardo Spinedi(1).

(1)Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, La Plata
mailto:imbice@netverk.com.ar

En el Núcleo Arcuato (NA) se sintetizan y se expresan receptores para distintas señales reguladoras del apetito. Para evaluar el efecto de la destrucción del NA sobre las funciones adrenal y adipocitaria, ratas macho se inyectaron neonatalmente con monosodio glutamato (MSG, ip). Los animales MSG y Testigo (T) se sacrificaron entre 30-150 días y se determinó los niveles de ACTH, corticosterona (B) y leptina (Lep) en plasma. Se realizaron incubaciones con células adrenales totales, MSG y T de 120 d, estimuladas con ACTH (0,01-1 ng/ml) en ausencia o presencia de Lep (10 y 100 nM). Los valores plasmáticos no indicaron diferencias entre grupos para ACTH, sin embargo, el grupo MSG desarrolló una significativa ($p < 0,05$ vs T) hiper-corticosteronemia e hiperleptinemia, esta última acentuada a los 120 d ($34,29 \pm 3,11$ vs $9,27 \pm 2,05$ ng/ml en T, $p < 0,05$). In vitro, se halló una hiperrespuesta adrenal a 1 ng/ml de ACTH en MSG ($16,92 \pm 0,9$ vs $12,52 \pm 0,7$ ng B/ml en T, $p < 0,05$) y una inhibición de la Lep sobre la liberación de B post-ACTH sólo en células T ($10,07 \pm 0,83$ vs $15,9 \pm 0,7$ ng B/ml en MSG, $p < 0,05$). Estos datos indican que la lesión del NA indujo hiperleptinemia crónica, asociada a una falta de acción de la Lep sobre la función adrenal. La hipersensibilidad adrenal in vitro en el grupo MSG es consistente con los resultados de B plasmáticos. Nuestro estudio sugiere el desarrollo de una compensación adrenal, post MSG, quedando por determinar si el neurotóxico induce o no leptino-resistencia.

285. Defectos de conducción y miopatía cardíaca dilatada en ratones deficientes del receptor erbB4 en el corazón. Cecilia M. Hertig(1), Jorge Scaglione(2), Sergio Ghio(1), Julián Taranda(1), Ju Chen(3), Kenneth R. Chien(3), Kent Lloyd(4), Patricia Meckert-Laguens(5), Rubén P. Laguens(5), Hernán García-Rivello(5).

(1)Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (2)Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. (3)Departamento de Medicina, Universidad de California, San Diego (4)Departamento de Medicina, Universidad de California, Davis. (5)Servicio de Anatomía Patológica, Fundación Favaloro
mailto:chertig@dna.uba.ar

El factor de crecimiento de neuregulina, que activa los receptores tirosina quinasa erbB, juega un rol esencial en el desarro-

llo cardíaco embrionario y postnatal. Ratones mutados tanto en el gen de neuregulina como en el de los receptores erbB2 o erbB4 mueren a los 10.5 días de desarrollo embrionario y exhiben la falta de trabeculación de la pared ventricular. Los resultados del ensayo clínico de Herceptin, el anticuerpo humanizado contra el erbB2 que ha sido utilizado exitosamente para la reducción de tumores mamarios, resulta además en la dilatación de las cámaras ventriculares en el 27 % de los pacientes tratados con Herceptin y derivados de antracilinas. Nuestro objetivo es estudiar las actividades de neuregulina que son esenciales para la formación y el mantenimiento de la función cardíaca. A tal fin, hemos generado un modelo de ratón en el cual la inactivación del erbB4 es inducida en células del músculo ventricular mediante el sistema Cre/lox-P de recombinación genética. Los ratones deficientes en el erbB4 en el músculo ventricular sobreviven al nacimiento y desarrollan una forma de miopatía cardíaca dilatada. La disfunción cardíaca reside en la diferenciación defectuosa de las células del septum y de las fibras de Purkinje. Este estudio demuestra que la activación del receptor erbB4 interviene en la trans-formación de las células musculares del ventrículo en células especializadas que forman el tejido de conducción eléctrico

286. Efecto apoptótico in vivo del Interferón alfa-2b (IFN) sobre hígados preneoplásicos de rata. María de Luján Alvarez(1), Juan Pablo Cerliani(1), Juan A. Monti(1), Cristina E. Carnovale(1), Teresa Ronco(1), José M. Pellegrino(1), Gerardo Pisani(2), Cristina Lugano(2), María C. Carrillo(1).

(1)Instituto de Fisiología Experimental (CONICET) Fac. de Cs. Bioq. y Farmac. UNR (2)Área Morfología, Fac. de Cs. Bioq. y Farmac. UNR
mailto:ifise1@citynet.net.ar

Se ha descrito que el IFN ejerce acciones antiproliferativas y apoptóticas sobre líneas celulares de hepatocarcinoma. Sin embargo, aún no se conoce si previene la oncogenesis in vivo, en estadios tempranos del desarrollo tumoral. En este trabajo estudiamos la acción del IFN sobre focos preneoplásicos en hígado de rata, evaluando apoptosis. Los animales se dividieron en 6 grupos ($n = 5$ c/u): sujetos a un modelo de iniciación-promoción (G1), tratados con IFN: a) durante iniciación-promoción (G2), b) durante iniciación (G3), c) durante promoción (G4); sujetos solo al estadio de iniciación (G5) y tratados con IFN en este período (G6). El Índice Apoptótico en los focos se encontró aumentado en los grupos tratados con IFN ($G1 = 0,26 \pm 0,03$; $G2 = 0,42 \pm 0,02^*$; $G3 = 0,40 \pm 0,02^*$; $G4 = 0,40 \pm 0,04$; $G5 = 0,15 \pm 0,02$; $G6 = 0,23 \pm 0,01\#$). Los niveles de Bax en lisado hepático están significativamente elevados en los animales tratados con IFN ($G1 = 100\%$; $G2 = 252 \pm 6\%^*$; $G3 = 253 \pm 2\%^*$; $G4 = 157 \pm 6\%^*$; $G5 = 100\%$; $G6 = 335 \pm 14\#\%$). Por otra parte, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL se presentan disminuidas en dichos grupos. Finalmente, se observan niveles aumentados de Bax mitocondrial en los grupos tratados con IFN: $G1 = 100\%$; $G2 = 156 \pm 7\%^*$; $G3 = 130 \pm 2\%^*$; $G4 = 84 \pm 11\%$; $G5 = 100\%$; $G6 = 219 \pm 40\#\%$ ($*p < 0,05$ vs. G1; $\# p < 0,05$ vs. G5). En conclusión, los hepatocitos preneoplásicos de ratas que recibieron IFN sufren muerte celular programada como resultado de un aumento sustancial de Bax y de su translocación a la mitocondria.

Ganador del Premio «Rubén Cherny»

COMUNICACIONES EN POSTERS

GASTROENTEROLOGÍA II

287. Interacción del aluminio con la entrada de calcio en enterocitos aislados de pollo. Daniel Orihuela(1), Verónica Meichtry(1).

(1)Fisiología Humana, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe
dorihuela@arnet.com.ar

El aluminio (Al) ingerido oralmente reduce la absorción intestinal de calcio (Ca) por la vía transcelular. Sin embargo las interacciones del metal con el complejo proceso de la entrada de Ca en los enterocitos desde el lumen intestinal no están completamente caracterizadas. Se analizó el efecto del Al, en forma de lactato, sobre la cinética de captación de ^{45}Ca (Ca-UPT) utilizando un modelo in vitro de células duodenales aisladas de pollo. El Al, variando de 0 a 150 μM , produjo una disminución tanto de V_{max} (Al 0: $22,1 \pm 3,4$; Al 100: $15,3 \pm 1,9$ nmol Ca/mg prot., $P < 0,05$) como de K_m (Al 0: $2,1 \pm 0,4$ mM; Al 100: $1,4 \pm 0,2$ mM, $P < 0,05$) de manera irreversible y dependiente de la concentración. El efecto del Al sobre la Ca-UPT, resultó ser sensible al pH (IC50 a pH 7,4: $30,1 \pm 2,3$ μM ; a pH 6,5: $19,3 \pm 7,8$ μM ; a pH 8,5: $51,2 \pm 10,6$ μM) e independiente del status de vitamina D del animal. La reducción de la Ca-UPT por el Al fue parcialmente prevenida por los bloqueadores de calcio diltiazem 1 μM y nifedipina 10 μM . Por el contrario fue incrementada significativamente por Bay K8644, A23187 y capsaicina 20 μM . La deplección del calcio intracelular con U73122 produjo un ligero aumento de la inhibición. Estos resultados sugieren que el Al podría disminuir la captación de Ca actuando sobre diversas vías de entrada del calcio en los enterocitos de pollo.

288. Desarrollo de un hígado bioartificial con esferoides de hepatocitos porcinos: informe preliminar. Alicia S. Lorenti(1), Mariana R. Barbich(1), Martín de Santibañes(1), Alejandra Hidalgo(1), Carolina Pontillo(1), Patricia Sorroche(1), Sung Ho Hyon(1), Candela Ceballos(1), Esteban Mele(1), Pablo Argibay(1).

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

Los hígados bioarticulares (HBAL) constan de un componente biológico y un sistema artificial de soporte, intercambio e inmunoadaptación. En nuestro modelo utilizamos esferoides de hepatocitos porcinos colocados en un cartucho de uso corriente en hemofiltración pediátrica (poro 50kD). El objetivo fue evaluar la capacidad de detoxificación del dispositivo en un modelo de hiperamonemia desarrollado en un circuito cerrado de sangre oxigenada. Los hepatocitos fueron aislados por doble perfusión y cultivados con agitación durante 2 días. La detoxificación fue evaluada por el metabolismo de amonio, partiendo de concentraciones iniciales equivalentes a las halladas en pacientes con falla hepática (340 $\mu\text{g}/\text{dl}$). La estructura de los esferoides fue analizada por MO y ME. El circuito fue evaluado cada hora, durante 9 horas, por hepatograma y medio interno. La concentración de amonio disminuyó gradualmente desde la hora 1, hasta llegar a la hora 9 al 37% de su valor inicial ($n=14$). Por microscopía se observaron esferoides compactos, con fibras reticulares, poros en superficie, canalículos biliares con microvelosidades y desmosomas. No se observó pérdida de viabilidad en los esferoides. Las variables de hepatograma y medio interno permanecieron estables. Estos resultados permiten concluir que el sistema descripto de HBAL podría cumplir funciones de detoxificación en pacientes con falla hepática. El siguiente paso consistirá en la utilización de un modelo animal equiparable a la clínica.

289. Acción citotóxica de la subunidad B de la toxina Shiga de Escherichia coli enterohemorrágica en colon de rata. Fernando A. Martín(1), Virginia Pistone Creydt(1), Elsa Zotta(1), Cristina Ibarra(1).

(1)Lab. de Fisiopatología, Dpto. de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA
ibarra@fmed.uba.ar

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción citotóxica de la subunidad B de la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) sobre la funcionalidad y morfología del colon de rata in vitro. En el tejido montado en una cámara modificada de Ussing se midieron el flujo neto de agua y la corriente de cortocircuito antes y después

del agregado de 200 μl de sobrenadantes de cultivo de E. coli recombinantes que expresan Stx2 completa o mutada. El dosaje de la actividad citotóxica sobre células Vero mostró que el sobrenadante de E. coli que expresa Stx2 completa tuvo una actividad similar a la observada en la cepa salvaje. En cambio, los sobrenadantes de E. coli que expresan Stx2 mutada no tuvieron actividad citotóxica. En colon de rata se observó que todos los sobrenadantes de cultivos presentan una inhibición significativa del Jw sin modificar los parámetros eléctricos. Esta acción fue comparable a la hallada con Stx2 pura a una concentración de 0,7 ng/ml y podría ser atribuida a un efecto directo de la subunidad B sobre los mecanismos que regulan el transporte intestinal de agua. El epitelio colónico incubado con sobrenadante de E. coli conteniendo Stx2 mutada mostró una destrucción de la superficie epitelial similar a la observada con Stx2 pura. Además produjo una hiperplasia folicular con proliferación de mononucleares hacia la mucosa intestinal. En conclusión, la subunidad B parece tener acción tóxica per se independiente de la presencia de la subunidad A.

290. Los Péptidos Natriuréticos A y C (ANF y CNP) son neuromoduladores de la secreción pancreática en la rata.

Maria E. Sabbatini(1), Marcelo S. Vatta(1), Natalia P. Catoira(1), María L. Jousse(1), Belisario E. Fernández(2), Liliana G. Bianciotti(1).

(1)Cátedras de Fisiología y Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. (2)Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.
lbianc@ffyb.uba.ar

Objetivo: Estudiar los efectos de la administración icv de ANF y CNP sobre la secreción pancreática y los mecanismos involucrados. Materiales y Métodos: Ratas SD fueron canuladas en el ventrículo lateral para infusión de ANF o CNP (1, 10 y 100 ng/microl). A la semana se canularon los conductos biliar y pancreático para recolección de secreción pancreática. Se administró atropina (75 microg/Kg), L-NAME (5microg/Kg) y propranolol (0.5 microg/Kg) y fentolamina (0.5 microg/Kg, 0.2 mg/Kg/h). Los resultados son $X \pm \text{SEM}$ (*: $p < 0,05$). Resultados: El ANF y el CNP (100 ng) aumentaron la secreción pancreática (microl/min/100 g) (15': control $0,085 \pm 0,004$ vs ANF $0,195 \pm 0,009^*$ vs CNP $0,21 \pm 0,01^*$) (30': control $0,082 \pm 0,006$ vs ANF $0,18 \pm 0,01^*$ vs CNP $0,197 \pm 0,006^*$) (45': control $0,083 \pm 0,006$ vs ANF $0,18 \pm 0,01^*$ vs CNP $0,196 \pm 0,005^*$) (60': control $0,080 \pm 0,005$ vs ANF $0,121 \pm 0,006^*$ vs CNP $0,20 \pm 0,01^*$). A los 30' también incrementaron la excreción de proteínas totales (microg/min/100 g): control $2,9 \pm 0,1$ vs ANF $9,3 \pm 0,6^*$ vs CNP $7,8 \pm 0,5^*$. El efecto no fue bloqueado por AT (30': AT $0,06 \pm 0,001$ vs AT+ANF $0,14 \pm 0,01$ vs CNP $0,24 \pm 0,01$), L-NAME (30': L-NAME $0,060 \pm 0,004$ vs L-NAME+ANF $0,15 \pm 0,01$ vs L-NAME+CNP $0,22 \pm 0,02$) ni P+F (30': P+F $0,066 \pm 0,002$ vs P+F+ANF $0,21 \pm 0,01$ vs P+F+CNP $0,20 \pm 0,01$). Conclusión: El ANF y el CNP estimulan a través de mecanismos nerviosos centrales la secreción pancreática y su contenido proteico, independientemente de vías colinérgicas, nitrérgicas o adrenérgicas.

291. ¿Cómo se comportan el TNF-alpha y el óxido nítrico séricos en distintos modelos experimentales de lesión hepática?. Carolina I. Ghanem(1), Paula C. Gomez(2), Camila Scorticati(2), José Antunes Rodriguez(3), Laura A. Bengochea(2).

(1)Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y bioquímica. UBA. (2)Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y bioquímica. UBA (3)Cátedra de Fisiología. Facultad de Medicina. Riberáo Preto. Brasil.
cghanem@ffyb.uba.ar

Introducción: Trabajos anteriores muestran el efecto protector de la colestasis cuando se suma una intoxicación aguda por paracetamol, en modelos experimentales. Tanto el óxido nítrico como el TNF han sido señalados como responsables directos o indirectos de lesión celular en numerosas patologías. El objetivo

del presente trabajo es detectar si el fenómeno arriba señalado se corresponde con modificaciones de óxido nítrico y TNF en suero. Materiales y Métodos: G1: colestasis quirúrgica de ocho días de evolución, G2: intoxicación con paracetamol (1g/kg peso), G3: colestasis quirúrgica de 8 días de evolución con intoxicación por APAP, G4: sham inyectadas con vehículo (n=5 para cada G). La detección sérica de óxido nítrico (ON) se realizó por quimioluminiscencia y el TNF mediante kit comercial. Asimismo se determinaron marcadores de lesión hepática. El test estadístico fue Anova. Resultados: ON (expresado en concentración micromolar)= G1: 91.03±48.97; G2: 104.79±30.71; G3: 71.23±14.94; G4: 31.92±4.51. TNF (expresado en picogramos/ml)= G1: 6.0±3.7; G2: 10.2±14.8; G3: 15.4±22.30; G4: 3.4±0.89. Conclusiones: Durante la intoxicación aguda por paracetamol en ratas colestáticas no se producen variaciones significativas en los valores séricos de óxido nítrico ni de TNF. En cambio, en ratas que padecen solo colestasis o solo intoxicación por paracetamol el óxido nítrico se encuentra aumentado y el TNF no mostró variaciones estadísticamente significativas.

292. Efecto del etanol sobre el metabolismo y la excreción hepática de CDNB Enrique J. Sánchez Pozzi(1), José M. Pellegrino(1), Elena J. Ochoa(1), Viviana A. Catania(1), Marcelo G. Luquita(1), Aldo D. Mottino(1).

(1) Instituto de Fisiología Experimental (IFISE). CONICET - U.N.R.
mailto:ifise1@citynet.net.ar

CDNB es útil para evaluar el sistema glutatión S-transferasa (GST) por ser sustrato de todas las isoenzimas que lo constituyen. Además, su derivado conjugado, el dinitrofenol-glutatión (DNPG) es transportado a nivel canalicular por el sistema MRP2. Objetivo: estudiar si etanol afecta in vitro el manejo hepático del CDNB en concentraciones similares a las de sangre portal luego de una ingesta moderada. Se realizaron estudios cinéticos de la actividad GST en citosol hepático de rata a distintas concentraciones de etanol (0, 1, 2 y 4 mM) y CDNB (0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 mM) y se midió el transporte de DNP-G en presencia de etanol (0, 1, 2 y 4 mM) en hepatocitos aislados preincubados con CDNB (100 mM). Resultados: las isoenzimas que conjugan CDNB se distribuyen en dos grupos (alfa y mu) cada uno con distinta Km (alfa: 0.03±0.01 mM, mu: 1.5±0.3 mM), el estudio cinético demostró que etanol inhibe en forma no competitiva las isoenzimas mu (Ki 73±25 mM) sin afectar las alfa. En cuanto al transporte de DNPG, etanol disminuyó significativamente su excreción con respecto al Control (100%), 1mM: 84±20 %, 2 mM: 72±8 %* y 4 mM: 56±10 %* (*p<0.05). Conclusión: etanol puede afectar el metabolismo y la excreción de xenobióticos. El valor de Ki para la GST sugiere que probablemente no se altere la conjugación en concentraciones habituales. En cambio, el efecto sobre el transporte de DNPG sugiere afectación de la excreción de endo y xenobióticos que utilizan el sistema MRP2

293. Expresión de la proteína resistente a multidrogas (MRP2) en hígado e intestino de ratas tratadas con espironolactona (E). Viviana A. Catania(1), Marcelo G. Luquita(1), Enrique J. Sánchez Pozzi(1), José M. Pellegrino(2), Justina E. Ochoa(3), Aldo D. Mottino(1).

(1) Instituto de Fisiología Experimental (CONICET)- Fac. Cs. Bioq. y Farm. (UNR) (2) Instituto de Fisiología Experimental (CONICET)- Fac. Cs. Bioq. y Farm. (UNR) (3) Instituto de Fisiología Experimental (CONICET)- Fac. Cs. Bioq. y Farm. (UNR)
ifise1@citynet.net.ar

MRP2 es un transportador de aniones orgánicos conjugados con glutatión, sulfato o ácido glucurónico, localizado en la membrana apical del hepatocito y del enterocito. Se evaluó el efecto in vivo del tratamiento con el inductor E (dosis: 200 µmoles/kg peso corporal/día, durante 3 días consecutivos) sobre la expresión de MRP2 en hígado e intestino delgado de ratas Wistar ma-

chos adultos. Los testigos (T) recibieron el vehículo de E. Se analizó el contenido de MRP2 por western blot y posterior densitometría en vesículas mixtas de hígado (H) y en vesículas de brush border de intestino delgado, el cual fue dividido en cuatro segmentos iguales (A, B, C y D, desde la zona más proximal a la más distal, respectivamente). Los resultados fueron (en unidades arbitrarias, media±SD, n=3): H(E)=761±89 significativamente diferente (p<0.05) de H(T)=485±60; A(E)=141±24 y B(E)=120±28 significativamente diferentes (p<0.05) de A(T)=78±18 y B(T)=23±4. En los segmentos intestinales C y D la detección de MRP2 fue dificultosa tanto en el grupo testigo como en el tratado. Se concluye que E es un efectivo inductor de MRP2 tanto en hígado como en los segmentos intestinales donde la proteína normalmente se expresa. Puesto que E es un efectivo inductor de enzimas de Fase II (glutatión-S-transferasa y UDP-glucuronosiltransferasa), se concluye que dichas enzimas y MRP2 podrían actuar coordinadamente en el mejoramiento de la metabolización y excreción de endo- y xenobióticos en condiciones de inducción.

294. Efecto de la preservación hipotérmica de hepatocitos aislados de rata en la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) sobre la destoxificación de amonio. Sebastián D. Calligaris(1), Luciana L. Almada(1), Graciela Furno(2), Edgardo E. Guibert(3), Joaquín V. Rodríguez(4).

(1) Farmacología, Fac. Cs. Bioquím. y Farm. UNR (2) Estadística, Fac. Cs. Bioquím. y Farm. UNR (3) Biología Molecular, Fac. Cs. Bioquím. y Farm. UNR (4) Farmacología Fac. Cs. Bioquím. y Farm. UNR
mailto:caliga@ciudad.com.ar

La preservación hipotérmica (PH) puede modificar las funciones metabólicas del hepatocito y en consecuencia, comprometer su performance en el hígado bioartificial y/o trasplante hepatocelular. Utilizando hepatocitos aislados de rata (HC) se estudió el metabolismo del amonio (NH₄⁺) durante la PH y posterior reoxigenación. Los HC fueron preservados (0 °C, 72 hs) en UW (grupo I) y en UW+Adenosina (Ad) 2.5 mM (grupo II). Luego los HC recién aislados y los preservados (HP) se reoxigenaron (37 °C, 2 hs) en Krebs-Henseleit adicionado con una sobrecarga de NH₄Cl 0.2 mM. Las determinaciones de NH₄⁺ se realizaron con un método cinético-enzimático. La viabilidad celular se estableció con el % de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). Los resultados mostraron que al cabo de 72 hs de PH, la [NH₄⁺]_{extracel.} se incrementó en presencia de Ad (I: 0.23±0.02 mM; II: 0.54±0.09 mM; n=5; p<0.05). La [NH₄⁺]_{intracel.} y la LDH fueron similares en ambos casos (I: 0.9±0.2 mM; 1.8±0.2 %; II: 1.1±0.2 mM; 2.4±0.5 %; n=5). En la reoxigenación, la eficiencia de eliminación de la sobrecarga de NH₄⁺, EDA= {[NH₄⁺]_{toH} - [NH₄⁺]_{2h}}/[NH₄⁺]_{0h} x 100, de los HP fue semejante a la determinada en HC controles (47.9±13.0 % HC vs 40.2±5.1 % HP; n=3) a pesar de la diferencia en LDH (9.9±2.8 % HC vs 17.7±4.5 % HP; n=3; p<0.05; 2 hs). Conclusiones: a) la PH no afecta la capacidad de los hepatocitos de destoxificar NH₄⁺, b) durante la PH en II se produce NH₄⁺ probablemente debido a la desaminación hidrolítica de la Ad.

295. La incorporación de ATP a la Solución de la Universidad de Wisconsin (UW) mejora la viabilidad funcional de hepatocitos sometidos a preservación hipotérmica/reoxigenación. María E. Mamprin(1), Angel Scandizzi(1), Graciela Furno(2), Joaquín V. Rodríguez(1).

(1) Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (2) Estadística. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.
mmamprin@fbioyf.unr.edu.ar

En este trabajo se analizaron diferentes estrategias destinadas a corregir la depleción de ATP que se produce durante la preservación de hepatocitos aislados de rata (HC), fenómeno que afecta la viabilidad funcional de los mismos en la reoxigenación. Para ello se adicionó a la sol. UW el precursor Adenosina (Ad) o ATP. Los HC fueron preservados (72 hs, 0°C, N2) en: 1) sol. UW

sin agregados, 2) sol UW+Ad 5mM, 3)UW+ Ad 10mM, 4)UW+ ATP 5 mM, 5)UW+ ATP 10mM y 6)UW+ ATP 15mM. Se determinó durante la preservación el contenido celular de ATP (nmol/106cél) y la liberación de láctico deshidrogenasa (LDH, %). A las 72 hs de preservación los HC del grupo 5 mostraron un mayor contenido de ATP: 24.81 ± 2.61 vs el grupo 3: 11.95 ± 1.48 (n=4, Anova *p<0.05). Finalizado el período de isquemia fría, los HC fueron reoxigenados (120 min, 37°C, carbógeno, Krebs-Henseleit) y se determinó el contenido celular de ATP, la liberación de LDH y la síntesis de GSH. El grupo 4 mostró a los 120 min. una mejor conservación de ATP: 14.82 ± 1.74 vs el grupo 3: 8.84 ± 1.12 n=3. La liberación de LDH y la síntesis de GSH mostraron un comportamiento similar. Se concluye que la incorporación de 10 mM ATP a la solución UW resulta más efectivo que Ad para evitar la pérdida de nucleótidos que se produce durante la preservación hipotérmica. Efecto que se correlaciona con una mejor capacidad de los HC para sintetizar GSH durante la reoxigenación.

296. Preservación de hepatocitos aislados de rata (HC) a temperatura subcero sin congelamiento. I- Desarrollo del protocolo experimental. Joaquín V. Rodríguez(1), Luciana L. Almada(1), Angel Scandizzi(1), Edgardo E. Guibert(2), Mario Secchi(3).

(1)Farmacología, Fac. Cs. Bioquim. y Farm. UNR (2)Biología Molecular Fac. Cs. Bioquim. y Farm. UNR (3)UME, Hospital Italiano de Rosario
mailto:jrodrig@fbioyf.unr.edu.ar

El objeto de este trabajo fue desarrollar un protocolo que permita preservar HC a temperatura subcero sin congelamiento. Basados en la propiedades coligativas de los dioles, se seleccionó el 1,4-butanodiol (BDL) como crioprotector (CP) y la sol. de la Universidad de Wisconsin (UW) como solución base. Los estudios realizados fueron: a) desarrollo de un método de dosaje de BDL por cromatografía gaseosa, b) se determinaron los puntos de congelamiento de UW + cc. variables del CP para obtener un valor mínimo de temperatura y una osmolaridad tolerable para los HC: con 8 % de BDL la osmolaridad ($1.776 \pm 22, n=5$ Osm/Kg H₂O) se correspondió un valor de -4.0 ± 0.2 °C. c) se estimó la penetración celular del CP a 0°C, determinando la conc. de BDL en el volumen acuoso intracelular (3H₂O, 14C-inulina): los resultados mostraron que la penetración es proporcional a la conc. extracelular del CP, 1.10 ± 0.15 mg/ml BDL intracelular / 1.0 mg/ml BDL extracelular. d) Se determinó la velocidad óptima de enfriamiento que garantice la no formación de hielo: 0 a - 4.0 °C en 60 min. e) se investigó la remoción del CP de los HC preservados por la técnica de dilución, para ello se determinó la conc. celular de BDL después de realizar lavados en sol. Krebs-Henseleit, (1er lavado <1% del contenido inicial, 2do lav.- no detectable). El protocolo desarrollado permite preservar HC a temperaturas subcero en condiciones de un estrés celular mínimo respecto de las técnicas de criopreservación convencionales.

297. Determinación de la permeabilidad osmótica al agua (Pf) del hepatocito por el método de centrifugación/filtración en capa de silicona.Sergio A. Gradilone(1), Elena J. Ochoa(1), Fabiana García(1), María C. Larocca(1), José M. Pellegrino(1), Raúl A. Marinelli(1).

(1)Instituto de Fisiología Experimental (IFISE - CONICET). Universidad Nacional de Rosario.
mailto:sgradilo@fbioyf.unr.edu.ar

Los hepatocitos pueden modular su Pf regulando el número de aquaporinas en la membrana plasmática (JBC 276:12147, 2001). La Pf de hepatocitos aislados se ha determinado por videomicroscopía, seguida del tedioso análisis de las imágenes obtenidas. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método alternativo de cuantificación de Pf. Se incubaron hepatocitos aislados de rata a distintos tiempos (5-30 segundos) en buffers de diferentes osmolaridades (300-30 mosM) conteniendo agua tritiada. Luego se filtraron por centrifugación rápida a través de una capa de silicona hacia un medio de lisis. La radioactividad medida en

el lisado se tomó como índice del flujo de agua inducido osmóticamente. Se observó que la radioactividad en los hepatocitos aumentó progresivamente con el tiempo de exposición y fue proporcional a la magnitud del gradiente. Utilizando la pendiente inicial de la curva radioactividad vs tiempo, la Pf calculada fue 18 ± 2 um/s (n=3). Para validar el método propuesto, se estimularon hepatocitos con dibutilil AMP cíclico, que produce un aumento de Pf al insertar aquaporinas en la membrana plasmática. La Pf obtenida fue mayor que el control (37 ± 2 um/s, p<0.05, n=3) y este aumento fue prevenido por el inhibidor de aquaporinas, dimetilsulfóxido. Estos datos no difirieron significativamente de los obtenidos por microscopía y análisis de imagen. Conclusión: el método desarrollado permite una determinación rápida y confiable de la Pf del hepatocito.

298. Preservación de hepatocitos aislados de rata (HC) a temperatura subcero sin congelamiento. II-Estudios de viabilidad funcionalLuciana L. Almada(1), Sebastián D. Calligaris(1), Edgardo E. Guibert(2), Mario Secchi(3), Joaquín V. Rodríguez(1).

(1)Farmacología. Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (2)Biología Molecular Fac. Cs. Bioquim. y Farm. UNR (3)UME, Hospital Italiano de Rosario
lalmada@fbioyf.unr.edu.ar

En el presente trabajo se analizaron los efectos causados por la preservación a temperatura subcero (-4°C) en solución UW con el agregado de 1,4-butanodiol 8% (UW-BDL), sobre la respuesta funcional de HC, mediante estudios de reoxigenación normotérmica (37°C-120min-carbógeno). Se realizaron tres grupos experimentales: I) HC recién aislados (n=3), II) HC preservados 72hs (UW-0°C-N2) (n=3) y III) HC preservados 120hs [UW-BDL(-4°C)] (n=3). Durante la preservación se determinó la liberación de LDH (%LDH), contenido de ATP (nmol/106cél) y Glutathion (GSH) (nmol/106cél), no encontrándose diferencias significativas entre los grupos II y III (III: %LDH=6.60±2.60, GSH=56.00±4.56 ATP=13.21±2.41). Durante la reoxigenación se estudiaron, además, la eficiencia de detoxificación de amonio (%EDA=((NH₄)₀h-[NH₄]2h)/[NH₄]0h)x100) y la reducción de sales de tetrazolium (MTT) (U.A./106cél). A los 120 min, el grupo III disminuyó la capacidad de retener LDH y mantener GSH (I: %LDH=9.9±2.9, GSH=30.25±4.1; II: %LDH=17.7±4.6, GSH=31.75±5.26; III: %LDH=26.7±0.88*, GSH=18.19±0.83*, Anova p<0.05). Los ensayos funcionales no arrojaron diferencias entre los tres grupos (%EDA: I=40.21±5.13, II=47.91±13.02 y III=40.97±10.45 y MTT: I=13.09±3.04, II=12.03±1.16 y III=10±1.14). Estos resultados sugieren que la incorporación de 1,4-BDL a la solución UW permite preservar HC a temperaturas subcero durante periodos prolongados de tiempo, manteniendo una viabilidad funcional similar a las células control.

299. Transporte hepático de Bromosulfotaleína en ratas parcialmente hepatectomizadas intoxicadas con Aluminio. Marcela González(1), Claudio Bernal(2), María C. Contini(1), María C. Carrillo(3).

(1)Fisiología Humana. Facultad de Bioquímica y CS. Biológicas. UNL. (2)Bromotología y Nutrición. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas.UNL. (3)Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNR
mailto:maidagon@fbc.unl.edu.ar

Se han estudiado los efectos producidos por el aluminio (Al) sobre el transporte hepático de aniones orgánicos (Bromosulfotaleína) en hígados regenerantes de ratas Wistar machos, adultas (n=5). Grupos experimentales; A: controles ; B: controles + aluminio (inyección intraperitoneal de Al elemental de 27 mg/Kg de peso, durante 3 meses); C: Hepatectomía (HP) 24hs; D: HP 48 hs ; E: HP 7 días; F: HP 24 hs + Al; G: HP 48 hs + Al; H: HP 7 días+ Al). Las hepatectomías fueron realizadas de acuerdo a la técnica descrita por Higgins y Anderson. El transporte hepático de BSF fue determinado por medio del análisis compartamental de Richards. Resultados obtenidos: Disminución significativa

($P < 0,05$) entre los siguientes grupos: A con B: 53% en r12, 47% en r23 y 32% en rendimiento; A con C: 50% en r12 y 34 % rendimiento; A con D: 58% en r12 y 42% en rendimiento; C con F: 48% en r12 y 56% rendimiento; D con G: 58% en r12 y 34% rendimiento; E con H: 65% en r12 y 30 % rendimiento. De los datos surge que la exposición al Aluminio ocasiona insuficiencia hepatocelular, probablemente inhibiendo la síntesis y/o traslocación de los transportadores hacia la membrana sinusoidal. La insuficiencia hepatocelular debido a la reducción de la masa hepática se pone de manifiesto en el proceso de captación de BSF probablemente debida a una disminución en el número de transportadores de aniones orgánicos. Cuando la insuficiencia es causada en forma conjunta los efectos son sumativos.

INMUNOLOGÍA VII

- 300. Caracterización de un panel de anticuerpos monoclonales anti-rhEPO.** María L. Zenclussen(1), Marcos R. Oggero Eberhardt(1), Ricardo B. Kratje(1), Marina Etcheverrigaray(1).

(1) *Laboratorio de Cultivos Celulares. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL*

El presente trabajo muestra la caracterización de un panel de cinco anticuerpos monoclonales (MAbs) anti-Eritropoyetina humana recombinante (rh-EPO). En una primera etapa estudiamos las características cinéticas y metabólicas del crecimiento de hibridomas en un cultivo batch estático durante 12 días con el objeto de evaluar las condiciones óptimas de producción de MAbs. Mediante SDS-PAGE y Western Blot observamos la secreción de fragmentos de inmunoglobulinas y anticuerpos completos en etapas tempranas del cultivo, existiendo en días posteriores una adaptación de los hibridomas para producir predominantemente las formas moleculares completas. Por otro lado, la afinidad de las inmunoglobulinas no demostró variaciones significativas durante el cultivo, conservándose aún en la fase de muerte celular cuando las condiciones del medio no son apropiadas para su estabilidad. Luego de establecer las condiciones óptimas de cultivo evaluamos desde el punto de vista inmunológico la capacidad de cada MAb para interactuar con rhEPO empleando diversas técnicas: SDS-PAGE nativo y desnaturizante, isoelectroforesis, Western Blot y ELISA. Los mencionados estudios demostraron la diferente capacidad de reconocimiento de rhEPO por parte de los MAbs, permitiendo seleccionar aquellos más apropiados para diferentes propósitos tales como el estudio del perfil de isoformas glicosídicas de rhEPO, su purificación por técnicas de inmunoadfinidad y el diseño de métodos de ELISA, entre otros.

- 301. La aglutinación de granulocitos inducida por el Mab murino anti-Lewis FC-2.15 está mediada por la activación de b2-integrinas y por la formación de complejos inmunes que involucran epitopes alfa-gal.** Mariana I. Capurro(1), Cynthia López Haber(1), Marcela Barrio(1), Laura Bover(1), José Mordoh(1).

(1) *Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, IIB-BA, Buenos Aires, Argentina. mailto:mbarrio@leloir.org.ar*

El anticuerpo monoclonal (Mab) murino FC-2.15 reconoce LewisX (LeX), presente en granulocitos humanos (PMN). Patológicamente, LeX se expresa en tumores epiteliales. FC-2.15 media la lisis de células LeX+ vía fijación de complemento (C'), e induce la aglutinación homotípica de PMN tanto in vitro como in SCSEV (sistema de circulación sanguínea ex vivo). Dicha aglutinación no se modificó por baja temperatura, 2-deoxiglucosa, iodoacetamida o azida sódica pero la fijación con formaldehído la inhibió completamente, sugiriendo que se trata de un proceso conformacional. Los siguientes resultados sugieren un rol para la b2-integrina (CD11b/CD18) en la aglutinación de PMN inducida por FC-2.15: 1) la aglutinación inducida por fMLP, por Mab KIM185 (activador de anti-b2-integrina) y FC-2.15 mostró requerimientos similares; 2) la

preincubación con Mab TS1/18 (bloqueante de b2-integrina), inhibió significativamente el proceso; 3) el monómero CD18 de la b2-integrina posee residuos LeX. Los MAbs murinos pueden contener residuos a-gal. La ausencia de alfa-1-3 galactosil-transferasa en el hombre, hace que a-gal sea altamente inmunogénico y que el suero humano contenga grandes cantidades de anti-a-gal Abs. Hemos demostrado que FC-2.15 contiene residuos a-gal, los cuales pueden eliminarse con alfa-galactosidasa, sin afectar la capacidad lítica de FC-2.15 (PMN o células MCF-7) y que la formación de complejos inmunes anti-a-gal Abs-FC-2.15 también contribuye a la aglutinación de PMN en SCSEV.

- 302. A new method for measuring ANTI-dsDNA reactivity in soluble phase and different ionic strength conditions.**

Laura M. Zarebski(1), Ana M. Di Lonardo(2), Nestor H. Coraggio(2), Fernando A. Goldbaum(1), Orlando G. Carballo(2).

(1) *Instituto de Investigaciones Bioquímicas UBA* (2) *Unidad de Inmunología, Hospital C.G. Durand, Buenos Aires, Argentina*
mailto:gabrielc@drwebsa.com.ar

The standard technique for Anti-dsDNA detection is Immunofluorescence (IF) in Crithidia. It is highly specific but detects both high and low affinity autoantibodies, of which only the high-affinity subpopulation is considered to be pathogenic. The Farr assay detects this subgroup at high ionic strength and may thus be the most useful test in the follow-up of the disease. However, it is difficult to apply routinely at the laboratory. We have developed a novel soluble-phase ELISA that is highly sensitive and specific to anti-dsDNA antibodies. In this method, sera from patients are analyzed at physiological salt concentrations, and those who render positive results are further analyzed using higher salt concentrations. We have tested sera from SLE patients that were either positive or negative in IF Crithidia assay. Out of 16 positive sera, all were also positive in our assay at physiological salt concentration, and most of them remained positive at 1M NaCl. Out of 17 negative IF sera, 8 were confirmed as negative, while 9 of them developed positive signals. This reactivity was abrogated at 1M NaCl in 8 of these 9 sera, indicating that it is sensitive to higher ionic strength. We tested the specificity of the assay with sera from patients of other systemic autoimmune diseases (10 CREST, 10 AR, 1 CMTD). All of them were negative in our soluble ELISA at 0.15 M NaCl. This new method shows promising results regarding to sensitivity, specificity and feasibility in the diagnosis of SLE.

- 303. Impacto de la acidosis extracelular sobre la capacidad de células dendríticas de inducir una respuesta inmune humoral.** Mónica Vermeulen(1), Mirta Giordano(2), Paula Fernández Calotti(2), Romina Gamberale(2), Karen Nahmod(2), Analía Trevani(2), Jorge Geffner(2).

(1) *Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina.* (2) *Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina*
mailto:monicavermeulen@infovia.com.ar

Examinamos de qué modo la acidosis extracelular afecta la fisiología de las células dendríticas. Para ello células dendríticas inmaduras obtenidas de precursores de médula ósea de ratones BALB/c se incubaron con peroxidasa de rábano (150 ug/ml) por 20 min a 37°C, a pH 7.3 o 6.7. Observamos que los niveles de endocitosis, evaluados a través de un ensayo colorimétrico, fueron mayores a pH ácido: densidad óptica a 492 nm (DO) 0.30 ± 0.05 vs 0.70 ± 0.04 (pH 7.3 vs 6.7, media \pm ES, n=5, p<0.05). Por otra parte, células dendríticas pulsadas con ovalúmina (OVA 50 ug/ml) por 18 hs a 37°C, a pH 7.3 o 6.7, se transfirieron (3 x10⁵) por vía endovenosa a ratones singéneos vírgenes, evaluándose al cabo de dos semanas la producción de anticuerpos específicos por ELISA. Los resultados obtenidos demuestran que la inmunización con células dendríticas pulsadas a pH ácido indujo mayores niveles de anticuerpos anti-OVA respecto de lo

observado para células dendríticas pulsadas a pH neutro: DO = 0.50 ± 0.01 vs 1.10 ± 0.04 , media \pm ES, $n=10$, $p < 0.05$, correspondiente a la valoración total de anticuerpos IgM + IgG en una dilución 1/50 del suero. Para todos los isotipos evaluados (IgM, IgG1, IgG2a e IgE) se observaron incrementos significativos en los niveles de anticuerpos específicos ($p < 0.01$). Los resultados obtenidos sugieren que el encuentro del antígeno con las células dendríticas en un microambiente ácido favorece la generación de la respuesta inmune humoral.

304. El TNF-alfa retarda la apoptosis de células neoplásicas en leucemia mieloide aguda. Gabriela Salamone(1), Karen Nahmod, Analía Trevani, Mónica Vermeulen, María C. Salamone, Mirta Giordano, Jorge Geffner.

mailto:gabrielasalamone@hotmail.com

Previamente demostramos que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) promovía la apoptosis de granulocitos neutrófilos. Aquí, examinamos su efecto sobre la apoptosis de células leucémicas provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA). Las células mononucleares fueron purificadas por gradientes de Ficoll-Hypaque a partir de muestras de sangre periférica o médula ósea, provenientes de pacientes no tratados, con porcentajes de blastos superiores al 50%. La apoptosis fue evaluada por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo (test de anexina V) durante un período de 5 días. Los resultados presentados corresponden al día en el cual las células no tratadas con TNF-alfa mostraron niveles de apoptosis superiores al 30%. Encontramos, en todas las muestras ensayadas, que el TNF-alfa (10 ng/ml) ejerció una notoria prevención sobre la apoptosis espontánea: % supresión de la apoptosis, 74 ± 17 ($n=11$, $p < 0.001$). Observamos, además, que el TNF-alfa ejerció también un notorio efecto preventivo en aquellos cultivos realizados en presencia de Idarubicina o Etopósido (1 ug/ml), agentes que promueven la apoptosis de células leucémicas mieloides: % supresión de la apoptosis, 75 ± 18 y 72 ± 8 , respectivamente ($n=6-7$, $p < 0.001$). Los resultados presentados indican que, en contraste con las observaciones realizadas en neutrófilos normales, las células leucémicas de pacientes con LMA son rescatadas de la apoptosis por efecto del TNF-alfa.

305. Receptores de tipo Toll en la infección por el virus del tumor mamario murino. Dalia Burzyn(1), Paula Berguer(1), Pedro Bekinschtein(1), Virginia Francisco(1), Mariana Graciarena(2), Irene Nepomnaschy(2), Isabel Piazzon(2).

(1)ILEX-CONICET. IIHEMA. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (2)LEX-CONICET. IIHEMA. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires
dburzyn@yahoo.com

El virus del tumor mamario murino (MMTV) activa e infecta inicialmente células B. Recientemente se ha demostrado que la envoltura del MMTV es capaz de unirse y señalizar a través de los receptores tipo Toll (TLRs) 2 y 4. Para estudiar el rol de los TLRs en la activación temprana de células B por MMTV, tolerizamos ratones BALB/c durante 3 días por vía sc con lipopolisacárido (LPS) de E.coli (2 ug/día) o peptidoglicano (PGN) de S.aureus (5 ug/día), induciendo hiporespuesta a estos ligandos de los TLRs. Inoculamos el virus en la almohadilla plantar de ratones a) no tolerizados, b) tolerizados con LPS y c) tolerizados con PGN. A las 24hs analizamos por citofluorometría la expresión del marcador de activación temprana CD69 en células B del ganglio linfático drenante. Los resultados se expresan como media del porcentaje de células CD69+B220+/B220+ \pm SD ($n=4$): (a) 54.2 ± 18.2 ; (b) 23.8 ± 3.1 ($p < 0.05$); (c) 22.0 ± 0.8 ($p < 0.05$); ratones no inoculados con MMTV: 15.71 ± 5.43 . Obtuvimos resultados similares utilizando la variante viral TBLV, que posee el gen sag deletado, lo que descarta la participación del superantígeno en la activación de las células B. Analizamos además el nivel de integración viral (PCR semicuantitativo) en el ganglio drenante y observamos una disminución de la integración en los ratones

tolerizados con LPS o PGN con respecto a los no tolerizados. Los resultados obtenidos sugieren que los TLRs podrían jugar un rol en las etapas tempranas de la infección por MMTV.

306. Células T reactivas al superantígeno en la glándula mamaria de ratones infectados con el virus del tumor mamario murino. Paula Berguer(1), Pedro Bekinschtein(1), Dalia Burzyn(1), Gabriela Lombardi(1), Carla Piazzon(2), Isabel Piazzon(2), Irene Nepomnaschy(2).

(1)ILEX-CONICET. IIHEMA. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (2)LEX-CONICET. IIHEMA. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires
pau_berguer@yahoo.com

El virus del tumor mamario murino (MMTV) se transmite por leche y es transportado al epitelio mamario por linfocitos. En los primeros días de vida, las células B de las placas de Peyer son infectadas y presentan el superantígeno (Sag) codificado por el MMTV a las células T Vbeta (Vb) específicas. Los linfocitos B infectados y las células T reactivas proliferan, aumentando así la carga viral. Las células T reactivas al Sag sufren luego una progresiva deleción clonal. Se investigó la cinética de activación y deleción de dichas células en órganos linfoides (por ej: ganglio (G) y bazo (B)) y en la glándula mamaria (GM) por técnicas citofluorométricas. Los porcentajes de células T Vb6+ CD4+/CD4+ a los 15, 30 y 40 días de vida en ratones no infectados se mantuvieron constantes en los órganos estudiados (rango 10.5-12.3%); en los ratones infectados con MMTV(LA) los valores fueron (media+ES($n=3$ experimentos)): 15días: G) 5.4 ± 0.5 , B) 4.4 ± 0.6 y GM) 11.3 ± 1.1 ; 30 días: G) 1.2 ± 0.6 , B) 1.8 ± 0.8 y GM) 8.1 ± 0.6 ; 40 días: G) 0.98 ± 0.7 , B) 1.5 ± 0.3 y GM) 3.9 ± 0.5 . En los ratones infectados la expresión de CD44 y de la integrina beta1 aumentó al día 15 en las células CD4+Vb6+/CD4+ en B y G, mientras que en la GM la activación se hace significativa al día 30. Estos resultados indican un retardo significativo en la cinética de activación y deleción de las células reactivas al Sag en la GM. Se discute el rol de estas poblaciones linfoides en GM en la infección del epitelio mamario.

307. Meliicina, un antiviral de amplio espectro de origen vegetal, induce la producción de TNF alfa en macrófagos peritoneales murinos. Erina Petrer(1), Celia E. Coto(1).

(1)Laboratorio de Virología. Depto de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.
mailto:erinapetrera@yahoo.com

Meliicina (Ma) es un antiviral obtenido de las hojas del árbol M.azedarach L. Ma inhibe la encefalitis por virus Tacaribe en ratones neonatos y la queratitis herpética estromal en adultos. Como en la patología de estas infecciones participa el sistema inmune, quisimos conocer si Ma actúa como agente inmunomodulador. Para ello estudiamos su efecto sobre la producción de TNF alfa en macrófagos murinos inducidos por LPS in-vitro. Macrófagos peritoneales de ratones BALB/c hembras de 6 semanas de edad se sembraron en microplacas de 24 pocillos (9 x 105 cél./pozo) con medio IMDM más 10% SFB. A las 24 hs de incubación a 37° C con 4% de CO2, los cultivos se lavaron e indujeron con 3 microgr.de LPS y los sobrenadantes se cosecharon a las 24 h. La actividad de TNF se midió por su acción citolítica sobre cél L (tratadas con Actin. D). Después de 24 h de incubación a 39° C se fijaron y colorearon con cristal violeta, la conc. del colorante se midió a 590 nm. La especificidad del TNF se determinó por neutralización con un monoclonal anti-TNF. Los resultados obtenidos fueron: a) el tratamiento con 50 ng de Ma sola no indujo TNF. b) el pretratamiento con Ma a las 24, 2 y 1h antes del LPS no alteró el nivel de producción de TNF. c) La inducción simultánea con LPS y Ma aumentó en 2 log. la conc.de TNF. d) ese efecto fue Ma conc dependiente.e) el TNF aparece a las 2h, el máximo es a las 4h manteniéndose hasta las 24h. Estos datos indican que Ma sinergiza el efecto inductor del LPS.

308. Oxido Nítrico y la respuesta inmune humoral hacia antígenos administrados por vía intranasal. Gisela Gamba(1), Ernesto J. Massouh(1), Fabián Benencia(1).

(1)Laboratorio de Inmunoquímica, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA.

Se estudió el efecto de la aminoguanidina (AG, un inhibidor de la iNOS) sobre la respuesta inmune en mucosa pulmonar hacia la administración intranasal de ovalbúmina (OVA) y toxina colérica (CT). Grupos de 10 ratones Balb/c se inocularon intranasalmente (día 0) con 10 µl de una solución de 10 mg de OVA y 1 µg de TC en PBS. A distintos días p.i se extrajeron turbinatos nasales y pulmones y por RT-PCR se observó que al día 2 p.i. se producía la activación de la iNOS mientras que en el día 5 p.i. se registraron muestras positivas para iNOS en pulmones. Grupos de 10 ratones se inocularon del día -2 al + 2 por vía intranasal con 10 µl de PBS (control) o distintas cantidades de AG (7.5, 2 y 0.5 mg/raton) en PBS. En turbinatos nasales y pulmones se observó un aumento en la expresión de TNF-alfa en los ratones tratados. A distintos días post-inmunización (pi) se obtuvieron los sueros y se titularon. Se observó un aumento específico de anticuerpos anti-OVA del tipo IgG en los ratones tratados. Mediante un ELISA de captura específico para OVA se determinó que dicho aumento no se debía a un mayor travasamiento del antígeno hacia el suero como producto del tratamiento con AG. Resultados similares se obtuvieron al titular anticuerpos anti-TC en suero mientras que no se registraron diferencias en animales inmunizados sólo con OVA. En este modelo, la inhibición de la iNOS potencia el efecto adyuvante de la TC a nivel de la mucosa pulmonar sobre la respuesta inmune humoral hacia OVA.

309. Unión del componente C9 del complemento (C) a la espectrina del citoesqueleto eritrocitario. Cintia K. Notcovich(1), Adriana M. Almará(2).

(1)IBR. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR (2)IBR-CIUNR. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.
mailto: malmara@arnet.com.ar

El objetivo de este trabajo fue evaluar la interacción del componente C9 del C humano con la espectrina del citoesqueleto eritrocitario. Se utilizaron eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos (EA) y se obtuvieron membranas por lisis con bajas dosis (1-2 UCH50) o con exceso de C (>5 UCH50), y por incubación en medio hipotónico de EA tratados con dosis sublétricas de C (EAC) o con suero inactivado (control). El análisis por SDS-PAGE de las membranas de EA lisados por exceso de C indicó la presencia de una banda intensa de 70 kDa de peso molecular (coincidente con el de C9 monomérico), no detectable en membranas de EAC o del control. Una banda tenue del mismo tamaño también fue observada en membranas de EA lisados por bajas dosis de C. En la electroinmunotransferencia con anti-C9, tanto las membranas de EA lisados por C como las provenientes de EAC mostraron una banda reactiva asignable a C9 monomérico, cuya intensidad se correspondió con la dosis de C utilizada. Además, las membranas de EA lisados por exceso de C mostraron dos bandas reactivas con anti-C9 a la altura de las subunidades alfa y beta de espectrina, que no se observaron en membranas obtenidas de EA lisados por bajas dosis de C, de EAC o del control. Los resultados obtenidos sugieren que, en condiciones de exceso de C, se produce una interacción entre C9 y la espectrina del citoesqueleto eritrocitario. Esta unión podría tener implicancia en el mecanismo de hemólisis intravascular mediada por C.

310. Inhibición de la actividad hemolítica del complemento (C) por bilirrubina no conjugada (BNC) 'in vivo'. Sandra M. Arriaga(1), Adriana M. Almará(2), Aldo D. Mottino(3).

(1)Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (2)Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR-CIUNR. (3)Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Instituto de Fisiología Experimental-CONICET.
mailto: malmara@arnet.com.ar

En este trabajo se evaluó la capacidad de BNC para atenuar una reacción hemolítica aguda C-dependiente provocada por una transfusión de eritrocitos heterólogos. Cuatro grupos de ratas Wistar (n=3), con anticuerpos hemolíticos naturales contra eritrocitos de carnero (GRc), se trataron por vía endovenosa con una infusión de concentraciones crecientes de BNC (grupos B1-B4). El grupo control recibió NaCl 150 mM (n=4). Después de 10 min, los animales recibieron una inyección única de 0,5 ml de GRc al 40% por la misma vía. A los 30 min se analizó la concentración del pigmento alcanzada en plasma y se evaluó la hemólisis por C cuantificando la hemoglobina en orina. La hemoglobinuria fue confirmada analizando los uroproteinogramas correspondientes. Los valores de BNC (mg/dl) fueron: control= no detectable; B1=0,9±0,3; B2=2,7±0,4; B3=4,7±0,4; B4=17,8±0,5. Los resultados de hemoglobina en orina (g/dl) fueron: control= 3,3±0,9; B1=1,8±0,3*; B2=0,5±0,4*; B3=0,5±0,3*; B4=0,1±0,1*; (*) p<0,05 vs control. Los uroproteinogramas del grupo control revelaron la presencia de una zona difusa de marcada intensidad con movilidad beta asignable a hemoglobina. En los animales tratados con BNC la intensidad de esta zona decreció en correspondencia con el aumento de la concentración del pigmento en plasma. Se concluye que BNC atenúa la capacidad hemolítica del C 'in vivo'. Este efecto anticomplementario del pigmento le asignaría un rol protector en las reacciones hemolíticas mediadas por C.

311. Prevención de la apoptosis de eosinófilos humanos por plaquetas. Silvina Raiden(1), Jorge Schettini(1), Karen Nahmod(1), Romina Gamberale(1), Mirta Giordano(1), Jorge Geffner(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina.

La identificación de aquellos factores capaces de modular la sobrevida de los granulocitos eosinófilos (E) resulta un área de potencial interés dada su prominente participación en los fenómenos alérgicos. Aquí, examinamos la capacidad de las plaquetas (P) de modular la apoptosis de E humanos. Las P y E fueron purificados por técnicas convencionales y la apoptosis evaluada por microscopía de fluorescencia. Encontramos que las P lavadas previnieron la apoptosis de los E: % de apoptosis = 33 ± 4, 58 ± 5 y 85 ± 7 vs 4 ± 2, 7 ± 2 y 17 ± 4, para E incubados durante 24, 48 y 72 hs, en ausencia y presencia de P (relación E: P: 1: 10), respectivamente (media ± ES, n = 7-11, p < 0.001). Este fenómeno no requirió del contacto P-E, ya que observamos niveles similares de prevención en sistemas 'transwells', donde E y P se hallan separados a través de una membrana permeable: % apoptosis a las 48 hs de cultivo, 69 ± 8 y 15 ± 6, para E cultivados en ausencia o presencia de P (relación 1:10) (n=4, p < 0.01). La prevención en la apoptosis de los E se asoció a una expresión disminuída de Fas, evaluada por citometría de flujo: intensidad media de fluorescencia 1566 ± 311 vs 434 ± 128, para E cultivados por 48 hs en ausencia y presencia de P (relación 1:10), respectivamente (n=4, p < 0.01). Los resultados presentados indican que productos liberados por plaquetas, aún no identificados, previenen notoriamente la apoptosis de los granulocitos eosinófilos.

312. Los leucocitos polimorfonucleares disminuyen la capacidad inmunoestimuladora de las células dendríticas.

Sandra I. Zittermann(1), María L. Scimone(1), Paulo C. Maffia(1), Carolina C. Jancic(1), Viviana P. Lutzky(1), Leonardo Fainboim(1), Eduardo H. Chuluyán(1).

(1)Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UBA.
mailto:szittermann@hotmail.com

Las células dendríticas (CDs) producen factores quimiotácticos capaces de reclutar leucocitos polimorfonucleares (PMNL). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de los PMNL de modular la fisiología de las CDs. Utilizando CDs humanas (generadas a partir de monocitos en presencia de IL-4 y GM-CSF) analizamos el efecto de los PMNL o de sus medios condicionados (MC) sobre las CDs examinando: i) la capacidad de

estimulación de linfocitos T (LT); ii) la expresión de moléculas de superficie; iii) la capacidad endocítica; y iv) la producción de citoquinas. Las CDs tratadas con los MC mostraron una menor capacidad aloestimuladora de LT ($42 \pm 14\%$, $n: 8$, $p < 0.05$) comparadas con el control. Esta menor proliferación se correlacionó con una menor concentración de IFN γ en los cultivos (781 ± 3 pg/ml vs. 343 ± 178 pg/ml, CDs vs. CDs tratadas, $p < 0.05$). La incubación de las CDs con los PMNL disminuyó (11-46%) la expresión de MHC-clase I y II, CD40, CD86, CD18 y CD54 y la capacidad endocítica de las CDs (51%). La producción de TGF β , pero no IL-12, se vio aumentada tanto en su ARNm (74%) como en la proteína secretada (>100%). El rol de TGF β en la inhibición de la capacidad inmunoestimuladora fue confirmada bloqueando el efecto con un anticuerpo específico para esta citoquina. Estos resultados sugieren que los PMNL podrían modular la actividad de las CDs, induciendo una mayor producción de TGF β en las CDs.

313. Deficiencia hereditaria de Factor I. Hallazgos inmunológicos en una familia. María M. Caram(1), Alejandra Ginaca(1), Eva M. Rivas(1).

(1)Hospital de Niños Ricardo Gutierrez. Capital Federal gfgalde@intramed.net.ar

La deficiencia de factor I del complemento es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por una incontrolada activación de la vía alterna, con consumo de C3 y factor B y una mayor susceptibilidad a infecciones producidas principalmente por Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae y Neisseria meningitidis. Describimos un paciente de 5 años de edad, con historia de infecciones: otitis media aguda supuradas, celulitis en cara, 2 episodios de neumonía con derrame. Se interconsulta con nuestro servicio y se le realiza estudio inmunológico: Dosajes de IgG, IgA, IgM, subclases de IgG, C4, funcionalidad de Anticuerpos: normales; C3 disminuido, CH50 ligeramente disminuido, AH50 ausente (en más de 1 determinación). Se estudiaron los factores involucrados en la vía alterna: Factor I y Factor B muy disminuidos, Properdina y Factor H normales. Se lo asume como deficiente de Factor I, con deficiencia secundaria de Factor B. Por la herencia de la enfermedad se estudio a la familia.

	C3 mg/dl	Factor I mg/l	Factor B mg/l	Factor H mg/l	Properdina mg/l	AH50 minutos	CH50 UH/50
Paciente	40	5	< 38	580	19	A	160
Hermano	39	5	< 38	510	18	A	115
Madre	113	20	270	510	19	21	174
Padre	149	45	355	700	26	8	194
VN	(90-150)	(34-70)	(229-394)	(329-557)	(18-40)	(7-12)	(180-280)

A:ausente

Comentarios: 1.-El hermano presenta resultados de laboratorio comparables con los del paciente. Sin síntomas clínicos. 2.- En la madre se observan valores compatibles con heterocigosis, lo que no se constata en el padre.

314. Un nuevo método para detectar la infección con el virus de la hepatitis murina (MHV). Patricia A. Mathieu(1), Karina A. Gómez(1), Jean-Paul Coutelier(2), Lilia A. Retegui(1).

(1)IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires (2)Unit of Experimental Medicine. Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

mailto: lretegui@mail.retina.ar

El MHV es uno de los virus con mayor prevalencia en ratones de laboratorio, por lo cual se han elaborado varios kits comerciales para detectarlo; estos ensayos se basan principalmente en la presencia, en el suero de los animales infectados, de anticuerpos (Ab) dirigidos contra las proteínas virales. En un trabajo previo demostramos que en los ratones infectados con MHV existen autoAb que reconocen la fumarilacetato hidrolasa (FAH) de

hígado y riñón. Esta observación nos permitió desarrollar un nuevo método que consiste en medir, por medio de un ensayo inmunoenzimático (ELISA), la reactividad de los Ab anti-FAH generados por la infección con MHV; hallamos que la FAH de hígado de rata, simplemente purificada por precipitación con etanol y sulfato de amonio, puede ser utilizada como antígeno. Los resultados del ELISA mostraron valores de densidad óptica significativamente mayores para los sueros de ratones infectados con el MHV con respecto a los controles, mientras que no se observó reactividad con muestras provenientes de ratones infectados con el virus elevador de la lactato deshidrogenasa, el virus del tumor mamario o el virus de la leucemia murina. Por otro lado, se logró inmunizar ratones con la FAH de rata y así obtener sueros que constituyen los controles positivos internos del ensayo. Este método no requiere el manipuleo del virus, puede llevarse a cabo en cualquier laboratorio medianamente equipado y es muy económico comparado con los existentes en el mercado.

315. Identificación de regiones antigénicas del factor estimulante de colonias de granulocitos mediante la síntesis de péptidos en fase sólida. Verónica J. Marino(1), Aída Sterin-Prync(2), Leonor P. Roguin(1).

(1)Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires. (2)Bio Sidus S.A., Buenos Aires.

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citoquina que estimula la proliferación y diferenciación de precursores neutrófilos. En un trabajo previo, caracterizamos dos anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-G-CSF y demostramos que el mAb 6E3 reconoce un epítopo conformacional, mientras que el mAb 8C2 está dirigido principalmente contra un epítopo secuencial. Con el propósito de estudiar la interacción del G-CSF con receptores de células de origen mielóide, investigamos el efecto de los mAbs sobre las propiedades biológicas y de unión de la citoquina. Sólo el mAb 6E3 inhibió la proliferación de células inducida por G-CSF y la unión del mismo a sus receptores. Por otro lado, el mAb 8C2 mostró un comportamiento no neutralizante y reconoció una zona expuesta en el complejo G-CSF:receptor. Para identificar los epítopos reconocidos por los mAbs, utilizamos un método de mapeo basado en la síntesis de 84 octapéptidos superpuestos que representan la secuencia completa del G-CSF. La reactividad de los mAbs con cada uno de los péptidos obtenidos se analizó por ensayo inmunoenzimático. Aunque esta metodología no permitió detectar el epítopo 6E3, identificamos 3 regiones reconocidas por el mAb 8C2. Dos de estas regiones definen un epítopo conformacional constituido por las secuencias 39-52 y 155-164 del G-CSF. La tercer región (amino ácidos 115-124) representa un péptido homólogo al epítopo 8C2 que no sería reconocida por el Ab en la estructura nativa del G-CSF.

316. Moléculas proinflamatorias que estarían involucradas en la red de eventos mediados por CD44. Paula V. Cabrera(1), Guillermo Blanco(1), Sofía H. Greczanik(1), Marina V. Cápula(1), Glenda Ernst(1), Elida Alvarez(1), Silvia E. Hajos(1).

(1)Cátedra de Inmunología. Facultad de Bioquímica y Farmacia. UBA mailto:paulavc@ffyba.uba.ar

La unión CD44-ácido hialurónico nativo (AHn) participa en la locomoción leucocitaria y la unión a AH de bajo peso molecular (AHb) induce la síntesis de mediadores inflamatorios in vitro. En un modelo murino de inflamación inducida por zymosan evaluamos los eventos inflamatorios que estarían involucrados en los procesos mediados por CD44. Los leucocitos del exudado fueron evaluados a las 4, 12, 24, 48 y 72 h luego del estímulo. Se detectó un aumento del ARNm de CD44 (RT-PCR) con respecto a los controles (ratones inyectados con PBS) y de CD44 de superficie (FACS) a todos los tiempos. Los leucocitos se adherieron a placas incubadas con AHn (índice de adhesión (IA) a las 4 h 0.66

± 0.02 , 72 h 0.68 ± 0.03) o AHb (4 h 0.66 ± 0.03 , 72 h 0.67 ± 0.03) y migraron hacia AH en cámaras de quimiotaxis (índice de migración (IM): AHn 4 h 6 ± 0.08 , 72 h 5.7 ± 0.1 ; AHb 4 h 5.8 ± 0.3 , 72 h 5.6 ± 0.2). Ambos efectos fueron inhibidos por anti-CD44 (4h y 72 h: IA AHn 0.31 ± 0.03 , 0.39 ± 0.01 ; AHb 0.28 ± 0.01 , 0.38 ± 0.02 ; MSI AHn 1.89 ± 0.2 , 1.79 ± 0.1 ; AHb 4 h 2.1 ± 0.09 , 72 h 2.08 ± 0.3 , respectivamente). Se halló un aumento del ARNm de iNOS y de actividad de metaloproteasas (zymografía) con un máximo al principio del proceso, y niveles elevados de ARNm de IL-1 y TNF-alfa. La unión de CD44 a ambas formas de AH participaría en la locomoción de leucocitos. Los resultados muestran la evolución de mediadores de inflamación a lo largo del proceso en forma paralela con la expresión de CD44.

317. Mímica molecular de la interacción proteína-DNA por anticuerpos anti-idiotípicos. Laura M. Zarebski(1), Ma. Laura Cerutti(1), Fernando A. Goldbaum(1).

(1)Instituto de Investigaciones Bioquímicas - Fundación Campomar - Buenos Aires - Argentina
mailto:lzarebski@leloir.org.ar

A partir de dos anticuerpos monoclonales (MAbs ED10 y ED84) anti-DNA, de alta afinidad y secuencia-específicos contra un oligo de 18 pb de bases del genoma de HPV (Site35), estudiamos fenómenos de mímica molecular en el reconocimiento específico proteína-DNA. Los anticuerpos anti-idiotípicos son una herramienta poderosa para la construcción de un modelo de mímica molecular. Hemos inmunizado conejos con ambos MAbs anti-DNA y hemos obtenido antisueros de alto título (1/24000). Hemos purificado los anticuerpos anti-idiotípicos policlonales e inmunizado ratones, obteniendo una respuesta anti-Site35 significativa aunque de bajo título. Por hibridación de esplenocitos de dichos animales con células de mieloma hemos obtenido 3 hibridomas que reconocen específicamente a los Abs policlonales anti-idiotípicos. Estamos clonando estos hibridomas para evaluar el reconocimiento anti-DNA. En conclusión, hemos demostrado que es posible obtener una respuesta anti-DNA por inmunización xenogénea con los miembros de la red idiotoip-antidiotoip a partir de anticuerpos que exhiben especificidad de secuencia. El estudio molecular y estructural de los distintos miembros de esta red nos permitiera analizar las bases moleculares de la mímica funcional obtenida.

318. Detección de CD31 intracelular en linfocitos T. Viviana P. Lutzky(1), Romina P. Carnevale(1), Marcos Barboza(1), María C. Salamone(1), Leonardo Fainboim(1), Eduardo H. Chuluyan(1).

(1)Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires
mailto:viviapl@yahoo.com

CD31/PECAM-1 es una molécula de 130 KDa perteneciente a la superfamilia de las Inmunoglobulinas. Se halla presente en plaquetas, leucocitos y células endoteliales. Además de poseer un rol en la migración de leucocitos, la molécula interviene en la activación celular. En trabajos previos, demostramos la existencia de CD31 intracelular y un mecanismo de exo-endocitosis en ciertas líneas tumorales. El objetivo del presente trabajo fue detectar reservorios intracelulares de CD31 en linfocitos T (LT). En primer lugar confirmamos que un 35% de los LT expresan CD31 en la membrana (CD31m). Sin embargo, las marcaciones intracitoplasmáticas de la población total de LT demostraron la existencia de una única población de LT CD31+. La presencia de CD31 intracelular se confirmó separando (por 'sorting') las poblaciones CD3+ CD31m- y CD3+ CD31m+ (95% de pureza) y realizando posteriormente un 'Western Blot' para CD31 sobre la población CD31m-. Además, la caracterización de la población CD31m- arrojó el siguiente resultado: CD4+ = 60%, CD8+ = 21%; CD45RA+ = 58%, CD45RO+ = 52%. En tanto que la población CD31m+ es: CD4+ = 32%, CD8+ = 46%; CD45RA+ = 87%, CD45RO+ = 15%. Estos resultados demuestran que los LT CD31m- presentan reservorios intracelulares de la molécula.

319. La hiperosmolaridad como factor modulador de células dendríticas. Carolina C. Jancic(1), Leonardo Fainboim(1), Eduardo H. Chuluyan(1).

(1)Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires
cjancic@hotmail.com

El aumento de la osmolaridad extracelular modifica la expresión de moléculas de adhesión e inhibe la fagocitosis en ciertas poblaciones leucocitarias. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las características fenotípicas y funcionales de las células dendríticas (CDs) en respuesta al aumento de la osmolaridad extracelular. Se utilizaron CDs derivadas de monocitos diferenciados en presencia de IL-4 y GM-CSF. En primer lugar, se examinó la capacidad de un medio hiperosmolar (460-580 mOsm, 30-150 min., 37°C) de inducir la desadhesión de las CDs previamente adheridas a proteínas de matriz extracelular. Entre un 11 ± 1 y un $27 \pm 1\%$ (n=3) de las células se despegaron de la matriz en presencia de un medio hiperosmolar de 460 y 580 mOsm, respectivamente. Estos medios también disminuyeron la capacidad de captación de dextrán-FITC ($30 \pm 1\%$, n=2) y la expresión de moléculas MHC ($35 \pm 12\%$, n=3). Además, estas células mostraron una menor capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T alogénicos, comparada con las CDs presentes en un medio iso-osmolar (4700 ± 2300 vs. 9400 ± 4000 , n=4, p<0.05). Ninguno de estos efectos fue debido a la inducción de apoptosis o necrosis (medido mediante la marcación con anexina V-FITC y por fragmentación de ADN). Estos resultados sugieren que el aumento de la osmolaridad disminuye la capacidad de las CDs de endocitar antígenos y de estimular la proliferación de linfocitos T alogénicos.

320. Los inhibidores de serino-proteasas aumentan la capacidad inmunoestimuladora de las células dendríticas. Paulo C. Maffia(1), Sandra I. Zittermann(1), María L. Scimone(1), Leonardo Fainboim(1), Eduardo H. Chuluyan(1).

(1)Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UBA.
pmaffia@unq.edu.ar

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción de los inhibidores de serino proteasas sobre la fisiología de las células dendríticas (CDs). Se utilizaron CDs humanas generadas a partir de monocitos en presencia de IL-4 y GM-CSF. Estas células fueron incubadas con inhibidores de serino proteasas (aprotinina y leupeptina, 45 min., 37°C). Posteriormente, las células fueron lavadas y examinadas en su capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T alogénicos. Las CDs tratadas con aprotinina (10 mg/ml) fueron mejores estimuladoras de la respuesta alogénica comparadas con las CDs control (6939 ± 1176 vs 10148 ± 1745 , p<0.01, n = 17). También se observó un aumento al tratar a las CDs con leupeptina ($32 \pm 10\%$ de incremento, n = 12). Este efecto no se debió a cambios en la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) o accesorias. Sin embargo, las CDs pretratadas con aprotinina, pero no las controles, producen y liberan IL-12 (5.3 ± 1.8 pg/ml, n = 4). El efecto de la aprotinina y la leupeptina sobre la capacidad inmunoproliferativa y la producción de IL-12 fue específico para las CDs inmaduras ya que no se observó en las CDs maduras o en los monocitos. Estos resultados sugieren que los posibles inhibidores de serino proteasas fisiológicos estarían modulando la capacidad inmunogénica de las CDs inmaduras aumentando la producción de IL-12.

321. Ensayos de linfoproliferación antígeno-específica como herramienta diagnóstica en alergias a proteínas de leche de vaca. Rubén D. Motrich(1), Claudio M. Gottero(1), Carlos C. Rezzonico(2), Carlos C. Rezzonico(2), Virginia E. Rivero(1).

(1)Inmunología, Facultad de Ciencias Químicas, UNC
(2)Clínica del Niño, Córdoba
rmotrich@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Las alergias alimentarias se clasifican en inmediatas (AAI), mediadas por IgE y no inmediatas (AANI), mediadas por células. En este trabajo evaluamos si la metodología de proliferación celular frente a alérgenos alimentarios es de utilidad en el diagnóstico de AANI a proteínas de leche de vaca. Realizamos experimentos de proliferación de linfocitos de sangre periférica frente a antígenos de leche de vaca (a-lactalbúmina; b-lactoglobulina; caseína) en 15 niños clínicamente clasificados como alérgicos a leche de vaca y en 6 niños normales. Se clasificó a los pacientes de acuerdo al tiempo transcurrido desde el último contacto con la leche de vaca y se observó que el 86% de los pacientes con contacto reciente (<4 meses) mostraron índices de proliferación (IP) positivos para el ensayo. Sólo un 25% de los pacientes con contacto lejano (>4 meses) presentaron IP positivos. Ningún niño del grupo control presentó IP positivos. En los niveles de IgA e IgG específicas para b-lactoglobulina, encontramos que el 40% y el 20% de los pacientes mostraron niveles más elevados que los normales. En IgA e IgG específicas para a-lactalbúmina, observamos que un 20% de los pacientes, en ambos casos, mostraron niveles superiores a los normales. La marcada diferencia observadas en el ensayo de linfoproliferación antígeno-específica entre la población alérgica y la población normal nos permiten concluir que estos ensayos son una herramienta muy útil en el diagnóstico de laboratorio de las AANI.

322. Bases moleculares de la respuesta inmunosupresora inducida por Galectina-1: implicancias en el modelo de melanoma B16 murino. Natalia Rubinstein(1), Rosanna E. Ramhorst(1), Mariano Alvarez(2), Marta A. Toscano(1), Norberto W. Zwirner(1), Osvaldo L. Podhajcer(2), José Mordoh(2), Leonardo Fainboim(1), Gabriel A. Rabinovich(1).

(1)Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. UBA (2)Instituto de Investigaciones Bioquímicas, «Dr Luis F. Leloir», FCEyN, UBA
narubinstein@hotmail.com

Recientemente demostramos que galectina-1 (Gal-1) es uno de los principales factores inmunosupresores producidos por células de melanoma humano. En el presente trabajo nos propusimos: a) analizar las subpoblaciones linfocitarias sensibles a la apoptosis mediada por Gal-1, b) investigar las vías involucradas en la acción anti-inflamatoria de esta proteína, y c) estudiar la expresión y actividad inmunosupresora de Gal-1 en el contexto de melanoma murino (B16). Observamos una susceptibilidad selectiva a la apoptosis mediada por Gal-1 en linfocitos T (CD4+ y CD8+), utilizando cultivos de células mononucleares de sangre periférica, en presencia de estímulos mitogénicos y alogénicos. Este efecto inmunosupresor fue bloqueado al incorporar IL-2 o ZVD-fmk (inhibidor de caspasas) al medio de cultivo sugiriendo un mecanismo dependiente de caspasas y reversible por IL-2. A los fines de extrapolar nuestros resultados a un modelo experimental murino in vivo, confirmamos la expresión de Gal-1 en melanoma B16 (mGal-1) mediante ensayos de Western blot y RT-PCR. Posteriormente, subclonamos el cDNA de mGal-1 en su orientación antisentido (Lag-1/pcDNA6) y transfectamos con esta construcción células B16. Observamos disminución significativa de los niveles de mGal-1, respecto a la transfección con el vector control (pcDNA6). Las evidencias expuestas permiten generar nuevas herramientas para implementar estrategias de terapia génica antisentido in vivo que permitan modular la respuesta metastásica

323. Efecto del benznidazol (BZL) sobre la expresión de la sintetasa inducible del óxido nítrico (NOSi) y el factor de necrosis tumoral alfa (FNT) en el hígado de ratones con endotoxemia experimental. María F. Pascutti(1), Josianne Sanceau(2), Jeanne Wietzerbin(2), Oscar Bottasso(1), Silvia S. Revelli(1).

(1)Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario (2)Unite 365, Institut Curie, París, Francia
revelli@arnet.com.ar

Previamente demostramos que el BZL inhibe la expresión de la NOSi en macrófagos estimulados 'in vitro' con lipopolisacárido (LPS) y en el hígado de ratones C57BL/6 inoculados con LPS, a las 4 hs post-desafío (pd). Dado que los ratones también tienen menores niveles séricos de FNT a los 90' pd, se investigó si el BZL modulaba la expresión de esta citoquina a nivel hepático (sitio relevante en sepsis). Ratones C57BL/6 (n=10) se inocularon con 200µg de LPS/ratón, vía ip. La mitad de ellos recibió BZL (LPS+BZL), vía oral, 18 y 2 hs antes del desafío con LPS (200 mg/kg peso). Se obtuvieron los hígados a los 90' y 4 hs pd para la extracción del ARN total y posterior RT-PCR. La semicuantificación de los mensajeros se realizó luego de una co-amplificación y normalización con un control interno de b-actina. La expresión del ARNm para la NOSi fue evidente a las 4 hs pd, hallándose inhibida en un 72% en los LPS+BZL. La expresión máxima del FNT se observó a los 90' pd y el análisis densitométrico reveló una disminución del 24% en los LPS+BZL. Los niveles séricos de FNT fueron inferiores en el grupo LPS+BZL a los 90' pd, no mostrando diferencias a los 15 y 30' pd (media ± es pg/ml: 15', LPS 6.3 ± 4.8, LPS+BZL 16.5 ± 7.0; 30', LPS 479.6 ± 139.6, LPS+BZL 470.7 ± 133.6). Si bien la regulación negativa del BZL en la producción del FNT podría encontrarse a nivel de la síntesis de novo de la proteína, en el hígado el mecanismo no estaría operando principalmente a nivel transcripcional.

METABOLISMO I

324. El implante de células stem/progenitoras mesenquimáticas (MSC) autólogas acelera la regeneración ósea en un defecto inducido en el fémur de ovinos.

Stella M. Ranuncolo(1), Juan Pistani(2), Jorge Vanetta(3), Laura Ontivero Matamorro(2), Andrea Montoro(2), Carolina Vero(2), Silvana Ferrari(2), José Bruni(3), Elisa D. Bal de Kier Joffé(1), Lydia I. Puricelli(1).

(1)Area Investigación, Instituto de Oncología A H Roffo (2)Area de Cirugía y Anestesiología, Facultad de Ciencias Veterinarias (3)Servicio de Ortopedia y Traumatología, Instituto de Oncología A H Roffo
invroffo@fmed.uba.ar

La osteogénesis embrionaria y la remodelación y reparación ósea en el adulto involucran a las MSC. Objetivos: cultivar MSC ovinas y evaluar, una vez sembradas en soportes óseos bovinos, su capacidad de reparar defectos producidos en el fémur de ovinos. Aspirados de MO se separaron en gradientes de densidad continua. La fracción rica en MSC se cultivó con DMEM + 10 % SFB. La población de células fibroblastoideas se duplicó cada 15 h. Luego del tratamiento con inductores osteogénicos las MSC forman esferoides y sintetizan una matriz rica en calcio (coloración von Kossa). In vitro, las MSC se adhieren y sobreviven en soportes de hueso bovino. Se realizó osteotomía > 2,1 cm (espacio crítico) en el fémur de 10 ovinos hembras de 2 años y 50 kg. Las ovejas se randomizaron en tres grupos: A) osteotomía sin implante (n=2), B) osteotomía con soporte óseo (n=4) C) idem B + MSC autólogas sin inducción osteogénica (n=4). A todos se les practicó osteosíntesis con placa metálica. Las ovejas se controlaron con Rx cada 15 d durante 6 meses. El grupo A formó callo hipertrófico sin consolidación. El B mostró una intensa reacción perióstica que incluye al implante con persistencia de una brecha. El grupo C, que mostró una reacción perióstica menor, estableció un verdadero puente de consolidación entre los 3 y 4 meses post cirugía. Concluimos que la colocación de un implante sembrado con MSC autólogas favorece el desarrollo del callo y la regeneración del defecto óseo provocado en ovinos.

325. Interacción entre anestésicos volátiles e Isoniazida: Su acción sobre el metabolismo del hemo y el sistema metabolizante de drogas. Ana M. Buzaleh(1), Alcira M.C. Battle(1).

(1)Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias-Depto. Química Biológica, FCEN, UBA-CONICET
mailto: battle@mail.retina.ar

La Isoniazida (INH) se utiliza en el tratamiento de la tuberculosis y es una de las drogas que pueden precipitar ataques de Porfiria Aguda Intermitente (PAI). Hemos demostrado la actividad porfirinogénica de los anestésicos Enflurano e Isoflurano. Además, la INH induce el metabolismo del Enflurano en el hombre y en animales. Se investigó la acción del Enflurano e Isoflurano (1 ml/kg, i.p.) sobre el metabolismo del hemo y el sistema metabolizante de drogas en ratones a los que se les indujo una porfiria experimental con INH (75 mg/kg, i.p., 7 días). La anestesia en animales tratados con INH causó una inducción similar (300%, $p < 0,05$) en la actividad de 5-aminolevulínico sintetasa a la observada por INH sólo. El Enflurano produjo un aumento mayor en la actividad de Hemo oxigenasa (Hemo-ox) mientras que el Isoflurano anuló dicha inducción. Ambos anestésicos inhibieron 50% ($p < 0,05$) la actividad de Porfobilinógeno deaminasa, enzima afectada en la PAI. El sistema metabolizante de drogas se alteró drásticamente, con una mayor inducción en la actividad de P-450E1 y de Glutathion S-transferasa. La combinación INH-anestesia produjo un nuevo modelo experimental de PAI. Como consecuencia de la inducción de la Hemo-ox y del P-450, el pool de hemo regulatorio disminuyó drásticamente. Los resultados obtenidos serían consecuencia del aumento en el metabolismo de los anestésicos producidos por INH, reflejado por la inducción en la actividad de P-450E1 (mayor del 100%; $p < 0,05$).

326. Indicador de estrés oxidativo y antioxidantes totales: su relación con el estado metabólico en ratas diabéticas eSS.

Stella M. Daniele(1), Silvana Montenegro(2), María C. Tarrés(2), Stella M. Martínez(2), Lida S. Morisoli(3).

(1)Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR (2)Fac. de Cs. Médicas. CIUNR-UNR (3)Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR
mailto:lidamorisoli@arnet.com

El daño oxidativo por radicales libres es un mecanismo relevante en la patogénesis de la diabetes y de sus complicaciones vasculares. La rata eSS no obesa presenta diabetes tipo 2, con dislipemia y nefropatía incipiente a los 12 meses de edad. Con el objeto de estudiar el estrés oxidativo, factores antioxidantes y su correlación con parámetros metabólicos; se tomaron 12 ratas machos eSS y 10 Wistar (W) controles. Después de un ayuno de 10 h, se extrajo sangre. En una fracción con EDTA al 5% se determinaron sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS), superóxido dismutasa (SOD) y hemoglobina (Hb). En suero se cuantificaron antioxidantes totales (TAS), triglicéridos (Tg), glucosa (G) y fructosamina (FH2). Se encontraron niveles de TBARS (mmol/l) de $11 \pm 1,8$ en ratas eSS, significativamente mayores que en las ratas W ($3,4 \pm 0,6$), $p < 0,001$; TAS (mmol/l) en eSS ($0,48 \pm 0,03$) fue menor que en W ($0,82 \pm 0,05$), $p < 0,001$ y SOD (U/g Hb) no presentó diferencias significativas (eSS: 2060 ± 100 vs. W: 2111 ± 83). Se encontró en las eSS, hipertrigliceridemia, hiperglucemia e incrementada FH2; además de elevada correlación entre TBARS y FH2, TBARS y G; ($r: 0,91$; $p < 0,001$) y alta correlación negativa entre TBARS y TAS ($r: 0,94$; $p < 0,001$), FH2 y TAS ($r: 0,92$; $p < 0,001$). No hubo correlación con los Tg y ni con SOD. Aumento de la peroxidación lipídica y su elevada correlación con la hiperglucemia, asociados al defecto en la protección antioxidante, son compatibles al comportamiento hallado en diabetes humana

327. El epitelio mamario secreta factores proteicos que inhiben la diferenciación adiposa de los preadipocitos 3T3-L1.

Marcela A. Sandoval(1), Leonardo Bussman(2), Juan C. Calvo(3).

(1)Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA (2)Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET-UBA (3)Instituto de Biología y Medicina Experimental y Depto. de Qca Biológica, FCEyN, UBA
mailto:jcalvo@dna.uba.ar

La diferenciación del tejido mamario in vivo, requiere de la interacción bidireccional con el estroma adiposo adyacente. In

vitro, encontramos que el medio condicionado (MCD) de las células epiteliales mamarias (NMuMG) inhibía la acumulación de triglicéridos (Tg) en los preadipocitos 3T3-L1 en forma dependiente de la dosis. Nuevos ensayos demostraron que otras muestras, también de origen mamario, regulaban la acumulación lipídica en forma similar: homogeneizados celulares de NMuMG ($1,5 \pm 0,1$ ug Tg/ug ADN), medio condicionado de la línea celular HBL-100 ($3,4 \pm 0,2$ ug Tg/ug ADN), homogeneizados de HBL-100 ($5,7 \pm 0,3$ ug Tg/ug ADN), homogeneizados de acinos mamaros ($6,9 \pm 0,5$ ug Tg/ug ADN) y de mama completa ($3,2 \pm 0,2$ ug Tg/ug ADN) de ratas preñadas, comparados con el control positivo de diferenciación (MDI) ($18,4 \pm 0,4$ ug Tg/ug ADN). La expresión de marcadores de diferenciación de los 3T3-L1 (LPL y GPDH) y su actividad enzimática decrecen consecuentemente. La purificación parcial de proteínas del MCD de NMuMG permitió detectar fracciones inhibitorias de alto peso molecular: A ($5,9 \pm 0,6$ ug Tg/ug ADN) y B ($9,3 \pm 1,7$ ug Tg/ug ADN) contra MDI ($12,8 \pm 2,1$ ug Tg/ug ADN). Estos factores proteicos, secretados por las células no diferenciadas NMuMG, podrían ser los mismos que provienen de glándulas mamarias diferenciadas de ratas, encontrándose una correlación entre los sistemas in vitro e in vivo que explicaría la regulación de la acumulación adiposa en el estroma glandular.

328. Incremento en la densidad de LDL en la posmenopausia.

Laura Schreier(1), Valeria Zago(1), María Luz Muzzio(1), Gabriela Berg(1), Francisco Basilio(2), Regina Wikinski(1).

(1)Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (2)Servicio de Ginecología- Sección Climaterio, Hospital Durand, Buenos Aires.
mailto:leschreier@dbc.fyb.uba.ar

El mayor riesgo aterogénico de LDL densa se sumaría al aumento de LDL en la posmenopausia (PM). Nuestro objetivo fue determinar LDL densa en mujeres PM y premenopáusicas (preM) y relacionarla con parámetros antropométricos y bioquímicos. Se obtuvo suero en ayunas de 18 PM (46 a 60 años) y 15 preM (23 a 36 años), sin tratamiento hormonal o hipolipemiante, se determinó colesterol-LDL, triglicéridos y apoB. Se aisló LDL total ($d=1020-1063$ g/ml) y LDLd ($1048-1063$ g/ml) determinándose la proporción de LDLd con respecto a LDLtotal. En plasma postheparínico, lipasa hepática (LH) fue PM vs PreM: $16,1 \pm 1,9$ vs $12,3 \pm 1,1$ $\mu\text{molFFA/ml.h}$, media \pm ES, $p=0,05$. PM presentaron mayor proporción de LDLd, $24,0 \pm 1,8$ que preM: $19,4 \pm 1,0\%$, $p < 0,05$. El incremento en LDLd se asoció con: aumento en la edad ($r=0,47$, $p < 0,01$), índice de masa corporal ($25 \pm 0,7$ vs $21,3 \pm 0,5$ kg/m², $p < 0,01$) $r=0,51$, $p < 0,01$, distribución abdominal de grasa expresado como cintura/cadera ($0,81 \pm 0,016$ vs $0,76 \pm 0,011$) $r=0,37$, $p < 0,05$, LH $r=0,48$, $p < 0,02$ y TG ($132,4 \pm 12,9$ vs $72,9 \pm 6,5$ mg/dl) $r=0,45$ $p < 0,05$. No correlacionó con colesterol-LDL, apoB ni su cociente. El aumento de LDLd en PM se asoció con mayor grado de obesidad, su localización abdominal y la actividad de LH que interviene en el catabolismo de IDL a LDL.

329. Evaluación de la vitamina E contenida en las lipoproteínas aisladas.

Guillermo Gambino(1), Pablo Evelson(2), Marina Travacio(2), Virginia Cuadrado(1), Susana Llesuy(2), Regina Wikinski(1), Fernando Brites(1).

(1)Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (2)Cátedra de Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA
mailto:gggamb@yahoo.com

La vitamina E (Vit E) es transportada por las lipoproteínas, a las cuales protege de la oxidación. Su distribución entre ellas es controvertida, discrepancia que podría deberse a la forma de expresión de los resultados. En este trabajo, evaluamos el contenido de Vit E en lipoproteínas aisladas del plasma de 30 hombres (23 ± 3 años) por ultracentrifugación secuencial y comparamos diferentes formas de expresión. En cada fracción, se midió el contenido de Vit E por HPLC y la composición lipídica y proteica, empleando métodos estandarizados. Los resultados fueron expresados de distintas formas (Media \pm DE) en VLDL; IDL+LDL; y HDL;

respectivamente: Vit E (mg/dl plasma): $0,10 \pm 0,04$; $0,44 \pm 0,11$ a; $0,31 \pm 0,13$ ab. Vit E (%): 12; 52 a; 36 ac. Vit E/proteínas (10-2): $1,2 \pm 0,8$; $1,0 \pm 0,04$; $0,3 \pm 0,2$ ac. Vit E molar/masa lipoproteica molar: 53 ± 31 ; 12 ± 4 a; 10 ± 4 a (a p <0,0001 vs VLDL; b p <0,001 vs IDL+LDL; c p <0,0001 vs IDL+LDL). Los resultados varían significativamente de acuerdo a su forma de expresión. Por ejemplo, al evaluar la concentración plasmática y el porcentaje de Vit E, la fracción IDL+LDL tendría el mayor contenido. Al evaluar el cociente Vit E/proteínas, ampliamente utilizado, no se observan diferencias entre IDL+LDL y VLDL, mostrando las HDL el menor valor; y al evaluar la relación molar Vit E/masa lipoproteica, la VLDL sería la lipoproteína más rica en Vit E. En resumen, la forma de expresión de los resultados condiciona su interpretación con fines experimentales o clínicos.

NEUROCIENCIAS IV

- 330. Niveles sericos de prolactina en pacientes esquizofrénicos hospitalizados tratados con clozapina.** Norberto M. Zelaschi(1), Juana Rodriguez(2), Sergio Gaitan(2), Sergio Panizzo(2), Cecilia Chiodi(2), Azucena Sobrero(2), Fernando Archuby(3), Luis Zieher(4).

(1)Hospital Interzonal Especializado en Agudos y Crónicos «Dr. A. Korn» - Facultad de Medicina (UNLP) (2)Hospital Interzonal Especializado en Agudos y Crónicos «Dr. A. Korn» (3)Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP) (4)Facultad de Medicina (UBA) 4837485

Objetivos: La Clozapina (Cz) es un antipsicótico con potente acción antiserotonérgica y débil antagonismo dopaminérgico; el tratamiento agudo no produce hiperprolactinemia; su actividad prolongada sobre la prolactina (PRL) no ha sido aún completamente investigada. Método: Se estudió un grupo de 10 pacientes (5 varones y 5 mujeres; edad promedio: 44.10 ± 10.30) con diagnóstico de esquizofrenia (criterio DSM IV), tratados con Cz durante un lapso de seguimiento de 48 semanas (sem). Se realizaron determinaciones seriadas de prolactina (PRL), por el método ELISA, cada 6 semanas en ayunas y reposo, hasta un total de ocho dosajes por paciente; los valores obtenidos se compararon a un grupo control (GC), formado por 22 pacientes (11 varones y 11 mujeres; edad promedio: 52.05 ± 9.07) normales. El rango de dosis usado fue de entre 100 y 400 mg/día. Se utilizaron las pruebas de ANOVA no paramétrica de Kruskal - Wallis y de la U de Man Whithy. Resultados: Los valores promedio de PRL del GC (9.05 ± 4.04 ng/ml) resultaron estadísticamente similares al grupo tratado. (H = 5.75; p = 0.68); sem. 6 (11.56 ± 5.91), sem. 24 (12.45 ± 7.84), sem. 48 (8.40 ± 2.72). Las edades no alcanzaron a ser estadísticamente diferentes entre el GC y el tratado con Cz (U = 62.00; p = 0.051). Conclusiones: Estos resultados muestran que durante el tratamiento prolongado con Cz los niveles séricos de PRL persisten invariables en tanto se mantiene la actividad terapéutica.

- 331. Efecto de la melatonina sobre el sistema nitrgico en la retina del hamster dorado.** Geraldine B. Sacca(1), Daniel A. Sáenz(1), Adrián G. Turjanski(2), Fabio Doctorovich(2), Marcelo Martí(2), María I. Keller Sarmiento(1), Darío A. Estrin(2), Ruth E. Rosenstein(1).

(1)Dpto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA (2)Dpto. de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA mailto:ruthr@fmed.uba.ar

En trabajos previos hemos demostrado que la melatonina es capaz de reaccionar con óxido nítrico (NO) dando un producto estable la N-nitrosomelatonina. Otros autores han demostrado que la melatonina inhibe la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en el sistema nervioso central de la rata, posiblemente a través de su interacción con calmodulina. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la melatonina sobre el sistema nitrgico retiniano. Cuando las retinas se preincubaron con

melatonina (1pM - 10nM), luego se homogeneizaron y se determinó la actividad de NOS, la melatonina inhibió significativamente esta actividad enzimática en las concentraciones examinadas. En cambio, cuando se examinó el efecto de la melatonina en homogenatos retinianos, no se observaron diferencias en este parámetro, aunque la trifluoperazina, un antagonista de calmodulina, lo inhibió significativamente. Asimismo, la melatonina disminuyó significativamente el flujo de arginina en fracciones sinaptosomales de retinas de hámster en concentraciones de 10nM y 100pM. El efecto de la melatonina tanto sobre la NOS como sobre el flujo de arginina involucró una disminución en la Vmax de cada uno de estos parámetros sin modificar la afinidad. La melatonina disminuyó significativamente la acumulación de GMPc inducida por arginina y por nitroprusiato de sodio. En suma, estos resultados indican que la melatonina podría ser un potente inhibidor del sistema nitrgico retiniano.

- 332. El rol del D-aspartato en la regulación de la liberación de factores hipotalámicos y del lóbulo neurointermedio de la hipófisis.** Macarena Pampillo(1), Teresa Scimonelli(2), Andrea De Laurentiis(1), Valeria Rettori(3), Beatriz H. Duvilanski(1), María C. Bottino(1), Adriana Seilicovich(1), Mercedes Lasaga(1).

(1)Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. (2)Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. (3)CEFYO, CONICET, Buenos Aires. mailto:mlasaga@fmed.uba.ar

El D-aspartato (D-Asp) está presente en SNC y glándulas endócrinas. Se investigó el efecto del D-Asp sobre la liberación de GABA, dopamina, LHRH, oxitocina, y alfa-MSH desde fragmentos hipotalámicos (FH) y desde el lóbulo neurointermedio (LNI) de la hipófisis de ratas machos. El D-Asp (1mM) aumentó la liberación de GABA desde FH (C: 1.77 ± 0.41 nmol/mg proteína; D-Asp: 3.44 ± 0.49 ; p < 0.05). Este efecto no se observó en presencia de AP-5 (0.1 mM) (antagonista de receptores NMDA) y de NAME (0.5 mM) (un inhibidor de la óxido nítrico sintasa). Por otro lado el D-Asp (1 mM) disminuyó la liberación de dopamina (C: 2.65 ± 0.22 ng/mg proteína; D-Asp: 1.72 ± 0.22 ; p < 0.05) y aumentó la liberación de LHRH (C: 5.43 ± 0.34 pg/mg proteína; D-Asp: 11.25 ± 2.82 ; p < 0.05), oxitocina (C: 18.47 ± 3.24 pg/mg proteína; D-Asp: 37.34 ± 4.91 ; p < 0.05) y alfa-MSH (C: 47.25 ± 4.50 pg/mg proteína; D-Asp: 57.00 ± 1.50 ; p < 0.05). Estos efectos no se observaron en presencia de AP-5. En el LNI, el D-Asp (1 mM) inhibió la liberación de GABA (C: 1.13 ± 0.12 nmol/mg proteína; D-Asp: 0.70 ± 0.06 ; p < 0.01), de oxitocina (C: 19.47 ± 2.84 ng/mg proteína; D-Asp: 8.67 ± 1.66 ; p < 0.01) y de alfa-MSH (C: 0.45 ± 0.026 ug/mg proteína; D-Asp: 0.23 ± 0.02 ; p < 0.001) mientras que no tuvo efecto sobre la liberación de dopamina. Nuestros resultados indican que el D-Asp modifica la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos que juegan un papel importante en la regulación de la secreción hipofisaria. Sus efectos a nivel hipotalámico podrían deberse a la activación de receptores NMDA.

- 333. Receptores y mecanismos intracelulares de la acción de las endotelinas 1 y 3 (ET-1 y ET-3) sobre la liberación de noradrenalina (NA) en el hipotálamo posterior de ratas normotensas.** Andrea S. di Nunzio(1), María S. Bertone(1), Liliana G. Bianciotti(2), Marcelo S. Vatta(1).

(1)Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (2)Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires mvatta@fyb.uba.ar

En virtud a la presencia de sitios receptores para ETs en neuronas catecolaminérgicas hipotalámicas, el objetivo del presente trabajo fue determinar los efectos de ET-1 y 3 sobre la liberación neuronal de NA, así como también, los receptores y vías intracelulares involucradas en el hipotálamo posterior de ratas

Sprague-Dawley macho (250-300g). Los estudios de liberación de NA se realizaron según Vatta y col. (Regul. Pept. 65,175,1996). Anteriormente, demostramos que la ET-1 y 3 (10nM) aumentan la liberación neuronal de NA en el hipotálamo posterior. El efecto producido por ET-1 se inhibió en presencia de los antagonistas de los receptores ETA y ETB, BQ-610 (100nM) y BQ-788 (100nM), respectivamente; contrariamente, la respuesta inducida por ET-3 no se bloqueó por ninguno de los inhibidores (BQ-610, 0.81±0.04 vs BQ-610+ET-1, 0.83±0.07 y BQ-610+ET-3, 1.19±0.02*; BQ-788, 0.9±0.03 vs BQ-788+ET-1, 0.91±0.05 y BQ-788+ET-3, 1.15±0.06*). El H-89 10uM, un bloqueante de la PKA, inhibió el efecto evocado por la ET-1 pero no por la ET-3 (H-89, 0.91±0.03 vs H-89+ET-1, 0.97±0.05 y H-89+ET-3, 1.02±0.04*). * p<0.05 (ANOVA y 't' test modificado por Bonferroni); n=5-9. En base a los datos obtenidos se puede concluir que ambas ETs actúan como péptidos moduladores de la transmisión noradrenérgica en el hipotálamo posterior, mediados por la activación de distintos receptores. Nuestros resultados sugieren que el efecto de ET-3 esta mediado por un receptor no ETA no ETB o un tercer tipo de receptor.

334. Efectos del CNP (Péptido Natriurético Tipo C) sobre la liberación neuronal espontánea de noradrenalina (NA) en presencia de inhibidores de canales de potasio. María S. Bertone(1), Carina Kadarián(1), Martín Rodríguez Fermepin(1), Daniela Meazza(2), Liliana G. Bianciotti(3), Marcelo S. Vatta(3), Belisario E. Fernández(3).

(1)Facultad de Farmacia y Bioquímica (2)Colegio Nacional Buenos Aires (3)Facultad de Farmacia y Bioquímica-CONICET
mailto:befernan@ffyb.uba.ar

En trabajos previos demostramos que el ANF (Factor Natriurético Atrial) y el CNP inhiben la liberación neuronal de NA; ambos se comportan como bloqueantes de canales de Ca²⁺ y el ANF tiene efecto simil-abridor de canales de K⁺. Objetivo: comprobar si el CNP 10nM actúa sobre canales neuronales de K⁺. Se estudió su efecto sobre la liberación de 3H-NA en presencia de bloqueantes de los canales de K⁺ ATP sensitivos (Glibenclámda 10mM, Gli), voltaje sensitivos (Dendrotóxina 100nM, DTX; MCD 100nM) y activados por Ca²⁺ (Iberiotóxina 100nM, IBT). Los experimentos se realizaron en hipotálamo de ratas Sprague Dawley según Vatta y col (Regul. Pept 65, 175, 1996). Resultados: fracción liberada ± ES (n: 6-12); *, #, f p<0.05 vs control, CNP y DMS+CNP, DMS, respectivamente (ANOVA-Tukey). Control 0.77±0.04, DMS 0.83±0.07, CNP 0.65±0.03*, DMS+CNP 0.65±0.05f, GLI 0.75±0.07, DTX 0.83±0.07#, MCD 0.80±0.04, IBT 1.01±0.09*, GLI+CNP 0.80±0.08, DTX+CNP 0.65±0.09, MCD+CNP 0.72±0.02, IBT+CNP 0.82±0.06#. Conclusión: El CNP se comporta como un abridor de canales de K⁺ Ca²⁺ sensitivos, en el proceso de liberación de NA, al revertir el efecto del bloqueante específico, sin alterar los canales ATP y voltaje dependientes.

335. Expresión de IGF-1 en médula espinal de ratas diabéticas. Verónica B. Dorfman(1), María C. Vega(1), Héctor Coirini(2).

(1)Lab. Neurobiología - Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Instituto de Biología y Medicina Experimental - Dpto. Bioquímica Humana, Fac. de Medicina, UBA neuro@dna.uba.ar

El factor de crecimiento insulínico (IGF-1) tiene acción neurotrófica sobre la médula espinal. Nuestro objetivo fue evaluar la presencia de éste péptido en la región lumbar, donde se localizan núcleos motores específicos que son alterados por una diabetes experimental. Los animales diabéticos (machos Sprague-Dawley) fueron generados por inyección vía vena femoral con estreptozotocina (60mg/kg peso corporal) y sacrificados luego de 13 ó 22 días junto con sus controles (n=6/grupo). Los tejidos fueron procesados para inmunohistoquímica. Los estudios sobre secciones coronales se realizaron con un anticuerpo policlonal (IGF-1, Península-dil:1/750). Los animales con 22 días de diabe-

tes, presentaron una reducción del 30% en la densidad óptica sobre láminas IV y V respecto a sus controles (p<0.05), sin modificarse la expresión a nivel celular. El área comprendida por el total de las células de dicha región, mostró asimismo una disminución del 56% (p<0.001). El tamaño celular promedio fue 1,97±0,1um² con 28±2 células/asta en diabéticos vs. 2,84±0,1 um² y 45±2 células/asta en controles. La región dorso medial presentó también una reducción del 52% del área inmunorreactiva fibrosa vs. control. No se observaron cambios en animales con 13 días de diabetes. Estos resultados sugieren una relación temporal entre la expresión de IGF-1 en la médula lumbar y alteraciones en la respuesta muscular en desordenes neurodegenerativos como la diabetes. (PIP0819/98 y TM12-UBA)

336. Cambios en los niveles de receptores para GABA-B con la edad en la médula espinal lumbar. Verónica B. Dorfman(1), María C. Vega(1), Héctor Coirini(2).

(1)Lab. Neurobiología - Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Instituto de Biología y Medicina Experimental - Dpto. Bioquímica Humana, Fac. de Medicina, UBA neuro@dna.uba.ar

El sistema GABAérgico ha sido asociado con la regulación del comportamiento sexual masculino. La infusión de baclofén induce reducción en la respuesta eréctil. Dado que fibras GABAérgicas se proyectan desde el hipotálamo hacia la médula espinal lumbar donde se encuentran las motoneuronas involucradas en la erección peneana y que el envejecimiento se acompaña de un declive en la actividad sexual, nuestro objetivo fue estudiar la evolución con la edad de los receptores GABA-B, en la médula espinal lumbar de ratas macho. Ratas Sprague-Dawley de 10 y 21 días, 3, 9 y 20 meses, fueron sacrificadas por decapitación (n=5/grupo). Secciones coronales de médula espinal lumbar 5-6 se incubaron con 3H-Baclofén 10nM ± GABA 10uM para la unión inespecífica. La lámina X mostró reducción significativa en la unión específica de baclofén en un 30% (p<0,05) en animales de 21 días respecto a los de 10 días, con disminución progresiva en animales de mayor edad. Sin embargo en las láminas II-III los cambios aparecieron luego de los 3 meses de edad (3 meses: 44.1±7.9 fmol/mg tej. húm. vs. 9 meses: 30.3±3.1 fmol/mg tej. húm.). El análisis en asta ventral mostró unión específica sólo en animales de 10 días (20.0 fmol/mg th). Estos resultados indican un proceso de maduración del sistema receptor en la médula espinal lumbar con variación específica de acuerdo con la lámina estudiada. Estos cambios podrían relacionarse directamente con el declive de la actividad sexual con la edad (PIP0819/98 y TM12-UBA).

337. Astrogliosis del hipocampo y alteración de parámetros neuronales en el modelo de diabetes tipo I inducida por estreptozotocina (STZ). Yanina Revsin(1), Flavia E. Saravia(2), Paulina Roig(1), Analia Lima(1), Françoise Homo-Delarche(3), Alejandro F. De Nicola(2).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA e Instituto de Biología y Medicina Experimental (3)Unité 8603 CNRS, Hopital Necker, Paris, Francia
mailto:revsin@hotmail.com

La diabetes se asocia a disturbios cognitivos y riesgo de enfermedades cerebrovasculares. Previamente, describimos en un modelo genético de diabetes tipo I (el ratón NOD) astrogliosis del hipocampo en los estadios prediabético y diabético. El objetivo del presente trabajo fue investigar la reactividad de astrocitos y función neuronal en ratones C57Bl/6 controles o tratados con una única dosis de 200 mg/kg de STZ 4 semanas antes del sacrificio. Los ratones diabéticos por STZ mostraron aumento del número de astrocitos inmunoreactivos/area para la proteína acida fibrilar de la glia (GFAP) (control(C):25.7±1.2; STZ:45.0±1.8, p<0.0001), determinada por análisis computarizado en el stratum radiatum del hipocampo. Se estudiaron parámetros relacionados con la activación neuronal del hipocampo (inmunoreactividad para Fos) y la vía de estrés oxidativo (histoquímica para NADPH-diaforasa, oxido

tumorigenicidad, al inocular 50000 células s.c., 10/10 ratones desarrollaron tumor LM38-RB y sólo 3/10 tumor LM38-RA. Concluimos que LM38-RB presenta una subpoblación de células mioepiteliales cuya presencia se asocia con tumores de histología papilar, alta tumorigenicidad y alta capacidad metastásica pulmonar y ganglionar.

- 342. Regulación de la actividad angiogénica por células presentadoras de antígeno.** Lilia E. Davel(1), María A. Jasnís(1), Alejandro J. Español(1), Eulalia de la Torre(1), Miriam J. Diamant(1), Eugenia S. de Lustig(1), María E. Sales(1).

(1)Instituto de Oncología Angel Roffo
mailto:davel@fmed.uba.ar

Los macrófagos (Mfs) desempeñan una función importante en el desarrollo tumoral. Estudiamos el papel modulador de los Mfs en la actividad angiogénica de células tumorales LMM3 y la participación de las vías de la óxido nítrico sintasa (NOS), arginasa y ciclooxigenasa (COX) en dicha respuesta. Metodología: a) Actividad angiogénica evaluada con el ensayo TIA (N° de vasos/mm²). b) Niveles de NO con el reactivo de Griess (uM/106 cel.). c) Actividad de arginasa como producción de urea (uM/106 cel.) d) Expresión de las isoformas de la NOS en células LMM3 y en Mfs por Western blot. e) Determinación de los niveles de prostaglandina E2 (PGE2) por RIA (pmol.106 cél). Resultados: Los Mf de ratones normales (MfsN) y de portadores de tumor LMM3 s.c. (MfsT) no inducen respuesta angiogénica. La respuesta vascular de células LMM3 (2,91±0,38) aumenta al coinocularlas con MfsT (5,01±0,50). Los MfsT producen menos NO (89,9±10,1) que los MfsN (126±11) y poseen una menor expresión de iNOS y nNOS; tienen mayor actividad arginasa (MfsT: 419±18 vs. MfsN: 74,4±6,5) y producen menos PGE2 (MfsT: 28,25 vs MfsN: 424,65). La angiogénesis inducida por LMM3 con MfsT tratados con inhibidores de COX (indometacina y NS-398), con inhibidores de NOS (L-NAME y aminoguanidina) o valina (interfiere la vía arginasa) se redujo significativamente (p<0.001). Conclusión: Los MfsT, que tienen alta actividad arginasa y baja actividad NOS y COX favorecerían la progresión tumoral.

- 343. Aumento de la cadena pesada de la catepsina B en pacientes con tumores invasores de vejiga.** Eduardo O. Sandes(1), María D. Riveros(1), Leonardo Pasik(1), Hector Malagrino(1), Francisco Celeste(1), Alberto R. Casabé(1), Ana M. Eiján(1).

(1)Instituto de Oncología Angel H. Roffo.
mailto: eosandes@hotmail.com

La catepsina B (CB) es una cisteino-proteasa lisosomal asociada al proceso de invasión tumoral. Se han descrito dos formas de CB activa una monocatenaria de 33 kDa y otra bicatenaria cuya cadena pesada es de 27-29 kDa según el grado de glicosilación. Anteriormente demostramos que la CB se encuentra aumentada en la orina de pacientes con carcinoma transicional de vejiga (CTV). En este trabajo estudiamos la expresión de CB en tumores de vejiga. Materiales y métodos: Se determinó la expresión de CB por la técnica de Western blot con anticuerpo específico para CB humana, en homogenatos de 22 tumores CTV. Según el grado de diferenciación histológica, 12 fueron de bajo grado (GI-GII) y 10 de alto grado (GIII-GIV), y según el status de invasión 10 fueron superficiales (pTa-pT1), 10 invasores (pT2-pT4) y dos sin especificar. Los resultados se expresan en ug CB/mg de proteína como mediana y rango. Resultados: Los tumores expresan una banda de 33 kDa y una banda de 27-29 kDa. Esta última se encuentra significativamente aumentada en tumores invasores (5,9 ug/mg, rango 1,6-8,9) respecto de los superficiales (2,4 ug/mg, rango 0,00-7,0) (p=0.008 por Kruskal-Wallis). No encontramos diferencia significativa respecto del grado de diferenciación histológica. Conclusión: Nuestros resultados indicarían que la CB bicatenaria se encuentra asociada al proceso de invasión tumoral.

- 344. Remisión total del tumor mamario murino LM3 intradérmico por tratamientos fotodinámicos repetidos con la porfirina sintética de segunda generación mesotetra (4-N-metilpiridil) porfirina (TMPyP).** Lucas L. Colombo(1), Juan C. Stockert(2).

(1)Área Investigación, Inst Angel H Roffo (UBA), y Conicet
(2)Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, y CSIC, España.
mailto:lucascol@mail.fmed.uba.ar

La terapia fotodinámica (TFD) se basa en la citotoxicidad producida por un fotosensibilizador (FS) captado por el tumor, que en presencia de luz origina oxígeno singlete (1O_2) y otras especies reactivas de oxígeno. Presentamos la respuesta del tumor mamario murino LM3 a tratamientos repetidos de TFD con TMPyP, inyectada intratumor. Tumores intradérmicos (diámetro: 2mm) en piel depilada de ratones machos BALB/c, recibieron 10mg de TMPyP en 0,1 ml de solución fisiológica (SF) intratumor. A la hora, bajo anestesia general, los tumores se irradiaron durante 45' por vía transcutánea (total: 280 J/cm²) con una lámpara de 35 W y reflector dicróico, filtro excitador azul-rojo (Imax: 419, 461 y 669 nm) y filtro anticalórico. La luz se guió por una varilla de cuarzo de 10mm de diámetro, apoyada sobre el área tumoral impregnada con glicerol para atenuar la dispersión de la luz. El tratamiento se repitió a días 2, 4 y 6. El diámetro tumoral (Xmm±DS), medido diariamente, de controles (C; inoculados con TMPyP pero no irradiados, n=15) vs TFD (n=17) fue: día 0: 2,13±0,46 vs 2,02±0,42 y día 9: 4.00±0,68 vs 0.20±0,31, p<0.0001. La TFD produjo regresión total en 15/17 tumores (duración: (Md) 3,5 días, rango: 1->42) y parcial en 2/17. Los tumores al día 37 midieron: C: 10.98±2,31 vs TFD: 6.31±3,39 p<0.0001. No hubo diferencias entre controles no tratados, luz sola, SF, y droga sola + anestesia. Estos resultados indican el alto potencial de la TFD repetida usando FS de segunda generación.

- 345. Diferente influencia del status tiroideo sobre el tumor primario y sobre las metástasis pulmonares, espontáneas y experimentales, en la línea de adenocarcinoma mamario murino LM3.** Lucas L. Colombo(1), Alicia J. Klecha(2), Gabriela Gorelik(2), Graciela A. Cremaschi(2).

(1)Área investigación, Inst. A.H.Roffo (UBA) y Conicet
(2)CEFYO (Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos)-Conicet.
mailto:lucascol@mail.fmed.uba.ar

Algunas evidencias sugieren un retardo del crecimiento tumoral por el estado hipotiroideo. Investigamos la influencia del status tiroideo en el crecimiento y formación de las metástasis pulmonares espontáneas y experimentales de la línea de adenocarcinoma mamario murino LM3. Hembras BALB/c fueron inoculadas diariamente desde el día -28 hasta el sacrificio o muerte, con Sol Fisiológica (Controles (C) n=11); más Propil-Tio-Uracilo, PTU 0,05% en bebida desde el día -14 (Hipotiroideo (Hipo) n=10), o con 40 ug/ratón de T4 (Hipertiroideo (Hiper) n=9). Al día cero recibieron 3x10⁶ células LM3 en el flanco subcutáneo (sc) o endovenosamente. No hubo diferencias en latencia ni en supervivencia. El peso tumoral sc al morir (mediana (rango) fue: C: 5.56g (2,77-11,88), Hipo: 3,68 (1,46-6,32), Hiper: 8,45 (6,92-13,52) (p<0.05, <0.005 y <0.0001) (Mann-Whitney test). Al día 38, previo a la primera muerte, los diámetros tumorales sc eran: C: 12,8mm (9,7-18,78), Hipo: 10,56 (7,9-13,16) e Hiper: 16,78 (9,7-21,05) (p<0.05, <0.05 y <0.005). El número de metástasis pulmonares 'espontáneas' fue: C: 58 (27-95), Hipo: 129 (12-176), Hiper: 14 (1-67) (p<0.005, <0.005 y <0.001) y el de 'experimentales' fue: C: 134 (12-186), Hipo: 203 (143-279), e Hiper: 53 (18-74) (p<0.05, <0.005 y <0.0005). El tamaño de ambos tipos de metástasis fue menor en Hiper (P=0.0002 Chi²) Estos resultados demuestran una correlación inversa entre crecimiento sc y formación de metástasis pulmonares en Hipo e Hipertiroidismo.

346. Modificación del comportamiento invasivo de dos adenocarcinomas mamarios murinos por acción de los mastocitos. Diego Bochoeyer(1), Lydia I. Puricelli(1), Juan C. Stockert(2), Lilia Lauria de Cidre(3).

(1)Instituto de Oncología Ángel H. Roffo (2)Departamento de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. España. (3)Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.
mailto:laurial@bg.fcen.uba.ar

Dado la hiperplasia de mastocitos (MC) y su rol contradictorio en tumores de distinto histotipo, estudiamos su efecto en la invasividad de dos líneas tumorales (LT) derivadas del mismo tumor primario: F3II y LM3, con alta y baja invasividad in situ respectivamente. Metodología: la adhesión a plástico se cuantificó a 60' en medio condicionado (Mco) de MC. La migración e invasión se evaluó en cámaras Transwell con el agregado de matrigel en el inserto, en el segundo caso. El citoesqueleto de actina se examinó con faloidina-FITC y la actividad de MMP por zimografía cuantitativa. Resultados: El McoMC disminuyó a 24.7±0.7% la adhesión a plástico de F3II y aumentó a 194±5.3% la de LM3; disminuyó la migración a 52.4±7.% en F3II y a 22.2±3.0% en LM3. Sólo en F3II el citoesqueleto de actina se observó desorganizado en presencia de MC, congruente con la disminución en la adhesión. El McoMC no afectó la invasión, pero cuando se cultivaron con MC en el inserto ésta aumentó a 157.0±18.1% y 185.2±20.5% en cada LT. Observamos que el McoMC expresa actividad de MMP-9 (105 kDa) y estimula además significativamente esta actividad en ambas LT. En todos los casos se consideró significativo un $p < 0.05$. Concluimos que las etapas invasivas iniciales de estas LT son moduladas diferencialmente por los MC a pesar de ser tumores de la misma estirpe. En ambas LT los MC estimularían la invasión no sólo a través del aporte de enzimas propias, sino estimulando la actividad de proteasas tumorales.

347. Detección de N-CAM en suero humano. Alteración de sus niveles en pacientes con tumores de cerebro.. Laura B. Todaro(1), Lydia I. Puricelli(2), María G. Pallotta(3), José Lastiri(3), María Lincuez(3), Elisa D. Bal de Kier Joffé(1), Mirta Varela(3), Eugenia Sacerdote de Lustig(1).

(1)Area de Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, UBA. (2)Area de Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, UBA. (3)Servicio de Oncología Clínica. Hospital Italiano de Buenos Aires
mailto:ltodaro@fmed.uba.ar

La molécula de adhesión N-CAM se expresa en el neuroectodermo, mesénquima y células tumorales derivadas de éstos. Puede hallarse en el suero aunque se desconocen sus niveles en distintos estados fisiológicos y patológicos. Objetivo: cuantificar N-CAM sérica en la población normal (n=35, 15 hombres, 20 mujeres) y en pacientes con gliomas (n=25), metástasis únicas en cerebro (n=22) y tumores benignos (n=19). Los niveles de N-CAM se cuantificaron por western blot y densitometría en dos situaciones diferentes: a) condiciones no reductoras, con un AcMo que revela bandas específicas de alto (>130kDa) y bajo (<130kDa) PM y b) condiciones de reducción incubando con un Ac. policlonal que reconoce una banda de 80kDa. En la población control las isoformas de bajo PM disminuyen con la edad ($p < 0,01$), mientras que las de alto PM son mayores en las mujeres ($p < 0,05$). N-CAM-80kDa, no varió en la población control y valores superiores al percentilo 80 se consideraron positivos. Sólo la población con gliomas presenta mayor número de pacientes con valores + ($p < 0,05$ vs control). Las isoformas < de 130kDa fueron menores que el control en todos los grupos de pacientes ($p < 0,05$). El nivel de las isoformas > de 130kDa no difiere del control. Conclusión: en la población estudiada la disminución de N-CAM < de 130kDa podría asociarse a patología cerebral, mientras que el aumento de la isoforma de 80kDa sólo se asocia con la presencia de gliomas.

348. Expresión de ciclinas D1, B1 y E y del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas p21 en cáncer de mama. Ma. del Carmen C. Vidal(1), Liliana Giménez(2), Giselle Peters(1), Laura V. Mauro(1), Eduardo Armanasco(1), Carlos Cresta(3), Elisa D. Bal de Kier Joffé(1), Lydia I. Puricelli(1).

(1)Area de Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, UBA. (2)Area de Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, UBA. (3)Area de Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, UBA.
mailto:lvmauro@yahoo.com.ar

Alteraciones en la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular se han asociado con patologías tumorales, proponiéndose su utilización como marcadores independientes de pronóstico. El objetivo de este trabajo fue estudiar en forma retrospectiva la expresión de las ciclinas D1, B1 y E y del inhibidor p21 mediante inmunohistoquímica en 57 tumores de mama. Los datos obtenidos fueron relacionados con los parámetros clínico-patológicos de cada paciente. Para ciclinas, se consideraron positivos los tumores con más del 10% de células con tinción nuclear, mientras que para p21 aquellos con más del 25%. Los niveles de ciclina D1 se incrementaron en forma paralela al número de ganglios comprometidos (G) (56.5% de casos positivos en G=0 vs 90% en G>3. $p < 0.01$). En cambio, tanto para la ciclina B1 como para el inhibidor p21, se observó una correlación inversa entre la expresión del marcador y el número de nódulos axilares (B1: 67% de positividad en G=0 vs 11.1% en pacientes G>3. $p < 0.05$; p21: 28.3% de casos positivos en G=0 vs 0% en G>3. $p < 0.05$). En un análisis multivariado estas diferencias se mantuvieron aún cuando se incluyeron otras variables de pronóstico como tamaño tumoral, grado histológico y nuclear, receptores estrogénicos, índice mitótico y grupo etario. Por otro lado, la expresión de ciclina E no se asoció con ninguno de los parámetros estudiados. Estos resultados sugieren relaciones complejas entre la expresión de diferentes ciclinas y la diseminación tumoral.

349. Estudio de los mecanismos asociados a la inhibición de la progresión tumoral inducida por Glipicano 3. Giselle Peters(1), Eduardo Farias(2), Lydia I. Puricelli(1), Jorge Filmus(1), Elisa D. Bal de Kier Joffé(1).

(1)Area de Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, UBA. (2)Area de Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, UBA.
mailto:mgpeters@hotmail.com

La glándula mamaria es uno de los pocos tejidos del adulto donde persiste la expresión del Glipicano 3 (GPC3). Previamente se demostró que la reexpresión del GPC3 en la línea de adenocarcinoma mamario murino LM3, induce tumores menos invasivos y metastásicos que los originados por la línea transflectada con el vector vacío (LM3-V). En este trabajo, nos proponemos estudiar in vitro algunos de los mecanismos involucrados en este efecto biológico. Se demostró que LM3-GPC3 posee mayor adhesión a fibronectina que LM3-V (73.5±13.9 vs 40.2±9.3%, $p < 0.05$). Asimismo, LM3-GPC3 presentó mayor adhesión célula-célula, formando racimos >50 células cuando se cultivó en suspensión sobre agar. Se determinó por IHQ que LM3-GPC3 posee mayor expresión de Caderina-E, una molécula de adhesión asociada inversamente con invasividad. Por otro lado, LM3-GPC3 no difirió de LM3-V en la producción de las proteasas MMP-9 y MMP-2. El tratamiento con TGF-Bs (20 mg/ml) no modificó esta expresión. En cambio, el tratamiento con IGF-II (10 mg/ml) aumentó 2.9 veces la secreción de MMP-2 en LM3-V, no detectándose dicha regulación en LM3-GPC3. Los clones LM3-GPC3 y LM3-V no difirieron entre sí en la capacidad de formar colonias en agar blando. En cambio, LM3-GPC3 fue más susceptible a la inducción de apoptosis por privación de suero que LM3-V (69.85±6.9% vs 33.98±0.4%, 96 hs). Estos resultados indican que el GPC3 puede modificar algunos procesos relacionados con el fenotipo invasivo/metastásico de células mamarias.

350. Modulación del fenotipo de células mamarias murinas normales mediado por las isoformas delta y zeta de PKC.

Alejandro J. Urtreger(1), Karina B. Falbo(2), Elisa D. Bal de Kier Joffé(1).

(1)Área de Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, UBA. (2)Área de Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, UBA.
mailto: urtreger@fmed.uba.ar

Las PKCs constituyen una familia de serino-treonina quinasas que intervienen en procesos de señalización intracelular cuya desregulación se ha asociado con transformación maligna y progresión tumoral. Con el fin de estudiar el rol de las PKCs en estos procesos, hemos transfectado en forma estable la línea celular mamaria 'normal' NMuMG con la isoformas delta (d) y zeta (z) de PKC (nueva y atípica respectivamente). In vitro, la sobreexpresión de estas dos isoformas no alteró la morfología ni afectó la tasa de proliferación celular (tiempo de duplicación poblacional 11±3hs.). Sin embargo las transfectantes alcanzaron una mayor densidad celular a las 96 hs. (PKCd 4,4x105±2,8x104 cél/cm2 vs. control 2,3x105± 3,5x104 cél/cm2 p<0.05 y PKCz 3,6x105±2,3x104 cél/cm2 vs control 2,8x105±0,6x104 cél/cm2, p<0.05). Estas diferencias se asociaron con un incremento en la capacidad adhesiva a plástico de las células que reexpresan PKC (PKCd 1.3 y PKCz 1.4 veces del control, p<0.05). La sobreexpresión de PKCd redujo la secreción de proteasas (uPA 0.25 y MMPs 0.65 veces del control, p<0.05). Mientras que la sobreexpresión PKCz, mostró un efecto inverso generando un incremento en la secreción de uPA y MMPs (1.96 y 1.91 veces del control, p<0.05). Estos resultados aportan nuevas evidencias sobre la diferente funcionalidad de las isoformas de PKC en la regulación de comportamientos celulares asociados al fenotipo maligno.

351. Caracterización histológica tumoral y clonado de loci afectados por el virus del tumor mamario murino (MMTV).

Albana Gattelli(1), Valeria Buggiano(1), Cecilia Cirio(2), Luisa A. Helguero(1), Silvia Vanzulli(3), Lucio Castilla(4), Edith Kordon(2).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (2)Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (3)Centro de Estudios Oncológicos. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (4)Program of Gene Function and Expression, University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA
albanagattelli@hotmail.com

En tumores mamarios inducidos por MMTV que evolucionan de un fenotipo hormono dependiente (HD) a independiente (HI), hallamos que esta progresión se produce asociada a la aparición de nuevas inserciones virales en el genoma tumoral. El análisis histológico de los tumores mostró que éstos presentaban una morfología ductal con distintos grados de diferenciación. No hallamos una clara correlación entre cambios de comportamiento y morfología de los mismos, sin embargo observamos que la progresión es acompañada por una pérdida significativa en la expresión de receptores de estrógenos (55+17% vs 10+2%, p<10-3) y progesterona (48+10% vs 11+5%, p<10-3) en tumores HD vs HI. Sería posible entonces que exista una vinculación directa o indirecta entre estos cambios en el nivel de receptores y las nuevas inserciones virales. A continuación, utilizando la técnica de PCR inversa iniciamos el aislamiento y clonado de sitios de inserción en tumores HI con el objeto de identificar genes celulares afectados. Este método permite la búsqueda de secuencias desconocidas en el genoma celular conociendo que las mismas están adyacentes a secuencias provirales. En nuestro modelo esta técnica nos permitió hallar inserciones de MMTV en el locus INT2, un gen cuya sobreexpresión está asociada a lesiones hiperplásicas ductales en la mama de ratón. Estos datos concuerdan con las características morfológicas observadas en nuestro modelo, sugiriendo que este gen podría estar jugando un rol central en el mismo.

REPRODUCCIÓN IV

352. Efecto de rhIGF-1 sobre la apoptosis en células testiculares prepúberes humanas en cultivo. Mariela I. Sciara(1), Esperanza B. Berensztein(1), Virginia L. Lencinas(1), Marco A. Rivarola(1), Alicia Belgorosky(1).

(1)Lab. de investigación. Hospital de Pediatría Garrahan
mailto:eberen@drwebsa.com.ar

Recientes estudios indican que el IGF-1 sería un importante factor modulador de la apoptosis. El objetivo fue evaluar el rol del IGF-1 sobre la apoptosis de células testiculares humanas inmaduras. Se estudiaron cultivos primarios de células testiculares de autopsia (n=4) y de cirugía de 2 pacientes, uno con pseudohermafroditismo masculino (pm) y otro con tumor de células de Sertoli. La apoptosis fue estimada al día 6, usando el kit DeadEnd TM de Promega. Al segundo día de cultivo, la monocapa se incubó con o sin rhIGF-1 (50 ng/ml), por triplicado, durante cuatro días. La presencia de células de Sertoli y la de células intersticiales fue evidenciada por la secreción de inhibina B y de testosterona en cultivo, respectivamente. El Índice Apoptótico (IA, número de células positivas por cien totales) fue 14.5 ± 4.67 en condición basal y 7.86 ± 3.22 bajo rhIGF-1 (x ± DS, n=4 cultivos) p<0.025. El IA en el testículo con pm fue 24.5 ± 5.96 basal y 16.1 ± 3.42 bajo rhIGF-1, (x ± DS n=3 wells) p < 0.036 y en el tumor de Sertoli fue, basal, 8.47 ± 1.52 y 4.39 ± 2.82 bajo rhIGF-1 (x ± DS n=3 wells) p< 0.045. Estos resultados indican que el IGF-1 inhibe la apoptosis de las células testiculares normales y anormales en cultivo, y sugiere que jugaría un rol en el mantenimiento de la masa celular intratesticular en la prepubertad.

353. Cultivo oviductal: acción de los medios condicionados sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano.

Adriana Caille(1), María J. Munque(1), Ileana Quintero(1), Sergio Ghersevich(1), Stella M. Daniele(1), Lida S. Morisoli(1).

(1)Laboratorio de Estudios Reproductivos, Area de Bioquímica Clínica, Universidad Nacional de Rosario

Previo a que tenga lugar el proceso de fertilización, el espermatozoide (esp) sobrelleva la reacción acrosomal (RA) en el oviducto. Nuestro objetivo fue evaluar la acción del medio condicionado de cultivo oviductal (MC) sobre la RA de esp humanos. Los MC se obtuvieron de cultivo de explantes de oviductos humanos de pacientes libres de patología tubaria, en medio HAM-F12/DMEM (1:1). Los esp capacitados 3h en medio Human Tubal Fluid (HTF) + 3,5% BSA, fueron expuestos 2h a 15 % v/v de MC o HTF (control). La RA fue inducida mediante ionóforo de calcio y evaluada por tinción con Pisum sativum. Los datos expresados como media ± SEM se analizaron mediante los tests de ANOVA y de Tukey-Kramer, y p < 0.05 fue considerado significativo. Los valores de viabilidad (con 0.5% eosina Y) y motilidad de los esp expuestos al MC o al HTF no presentaron diferencias (96.1± 1.8% vs 96.6 ± 1.7% y 61.9 ± 5.3% vs 63.9 ± 4.9%, respectivamente). Tanto los esp expuestos al MC o al HTF mostraron valores de RA espontánea (e) e inducida (i) similares (MCe: 6.4 ± 1.1% vs HTFe: 5.3 ± 0.5%; MCi: 28.1 ± 4.6% vs HTFi: 37.1 ± 3.4%, n=12). Este trabajo sugiere que el MC no afectaría la sobrevida de los esp, ni tampoco induciría la RA en esp capacitados. La previa exposición al MC no interferiría en la habilidad de los esp de sobrellevar la RA ante un estímulo inductor de la misma.

354. Actividad de MMP2 y sus factores moduladores en útero de rata sana y diabética durante la implantación. Carolina Pustovrh(1), Alicia Jawerbaum(1), Débora Sinner(1), Verónica White(1), Evangelina Capobianco(1), Elida Gonzalez(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos
mailto:carolinapustovrh@yahoo.com.ar

Las metaloproteasas participan en la implantación, proceso de remodelación tisular. Con el objeto de evaluar si MMP2 se encuentra alterada en tejido uterino diabético durante la implantación, se analiza su actividad y una posible acción moduladora por óxido nítrico (NO) y radicales libres del oxígeno (RLO). Tejido uterino de ratas controles (C) y diabéticas (D) por administración neonatal de estreptozotocina (100 mg/ Kg) se incubó en medio Krebs 60 min, determinándose en sobrenadante la actividad gelatinásica por medio de zimografía y en homogenato la actividad superóxido dismutasa (SOD). La actividad de MMP2 es mayor en útero D (1.66 ± 0.15) que en C (1 ± 0.08) ($p < 0.05$). En presencia de nitroprusiato de sodio 600 mM (dador de NO) se incrementa la actividad de MMP2 en C (1.62 ± 0.26) ($p < 0.01$), no modificándose en D (1.49 ± 0.07). En presencia de L-arginina metil ester 1000 mM (inhibidor de NO sintasa) la actividad de la MMP2 disminuye tanto en C (0.62 ± 0.07) ($p < 0.05$) como en D (0.88 ± 0.14) ($p < 0.001$). Adiciones de xantina/xantina oxidasa (X/X, dador de RLO) incrementan la actividad MMP2 (CX/X 2.69 ± 0.82 $p < 0.01$ v C; DX/X 3.45 ± 0.10 $p < 0.001$ v D), mientras que SOD (antioxidante) disminuye la actividad MMP2 en C (0.78 ± 0.08 $p < 0.01$) y no en D (1.61 ± 0.07). Se concluye que durante la implantación la actividad MMP2 uterina es modulada positivamente por NO y RLO, y que está incrementada en útero D donde dichos parámetros se encuentran alterados.

355. Efecto de la genisteína, un inhibidor de tirosina quinasas, sobre la inhibición inducida por el colágeno IV en la esteroidogénesis de las células de Leydig. Emilce S. Diaz(1), Eliana H. Pellizzari(2), Marta B. Casanova(1), Selva B. Cigorraga(2), Berta Denduchis(1).

(1)Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina, UBA. (2)Centro de Investigaciones Endocrinológicas. (CONICET). Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.
mailto:ciruba@fmed.uba.ar

Previamente demostramos que las proteínas de la matriz extracelular, tales como colágeno IV (C-IV) y fibronectina, inhiben la esteroidogénesis de las células de Leydig en condiciones basales y estimuladas con hCG. En este trabajo se analizó si la actividad de tirosina quinasas podría participar en la inhibición producida por el colágeno IV (C-IV). Se aislaron células de Leydig de rata adulta que se cultivaron durante 3hs en placas recubiertas o no con C-IV en presencia o ausencia de hCG (10ng/ml) y genisteína (1 microM). En las células cultivadas sobre C-IV se observó una inhibición de la secreción de testosterona. Las concentraciones de testosterona (ng/106 células) obtenidas fueron: en condiciones basales: sin C-IV: 16.93 ± 0.68 vs. C-IV: 13.41 ± 0.36 ($X \pm ES$, $n = 6$, * $p < 0.001$); y en presencia de hCG: sin C-IV: 177.89 ± 12.19 vs. C-IV: 142 ± 10.71 ($X \pm ES$, $n = 6$, * $p < 0.001$). La genisteína (G) produjo una disminución del efecto inhibitorio de C-IV sobre la secreción de testosterona, en condiciones basales: C-IV: 12.9 ± 0.76 vs. C-IV + G: 14.81 ± 0.12 * y en presencia de hCG: C-IV: 178.07 ± 4.27 vs. C-IV + G: 198.35 ± 2.4 ** ($X \pm ES$, $n = 5$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). La viabilidad de las células de Leydig no se modificó en ninguna de las condiciones estudiadas. En conclusión, los resultados sugieren que la interacción de las células de Leydig con C-IV a través de integrinas resulta en la activación de tirosina quinasas que regulan negativamente la producción de testosterona en células de Leydig.

356. Potencial uso de la proteína recombinante DE para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad. Diego Ellerman(1), Mauro M. Morgenfeld(1), Dolores Busso(1), Vanina G. Da Ros(1), Patricia S. Cuasnicú(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental
mailto:mmorgen@dna.uba.ar

Estudios previos de nuestro laboratorio indican que la inmunización de ratas con la proteína epididimaria DE produce una respuesta inmune específica y una inhibición significativa de la ferti-

lidad en ambos sexos. Recientemente, DE ha sido expresada en un sistema bacteriano como proteína de fusión (recDE) acoplada a MBP (maltose binding protein). Con el fin de investigar si recDE es capaz de generar la respuesta inmunológica observada con la proteína nativa (nDE), ratas machos y hembras adultas fueron inmunizadas con recDE, MBP, o nDE como control. La respuesta inmune fue analizada mediante Western blot y ELISA y la fertilidad evaluada por apareos con animales fértiles. Los resultados mostraron una respuesta inmune específica con títulos significativamente mayores en los animales inmunizados con recDE que en los grupos control. Los animales inmunizados con recDE o nDE mostraron % de fertilidad significativamente menores ($p < 0,05$) que los inmunizados con MBP (machos: MBP: 75, recDE: 33, DE: 28 y hembras: MBP:90, rec DE: 60, DE: 50). El análisis histológico de epidídimo y testículo descartó que dicha inhibición fuera debida a efectos patológicos sobre los órganos reproductivos. La capacidad de recDE de generar una respuesta inmune específica e inhibitoria de la fertilidad permite reemplazar la proteína nativa por la recombinante en ensayos de inmunización, apoyando fuertemente el potencial uso de DE para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad.

357. Influencia del bicarbonato en la capacitación y capacidad fertilizante del espermatozoide de rata. Vanina G. Da Ros(1), María J. Munece(1), Débora J. Cohen(1), Clara I. Marin(1), Dolores Busso(1), Pablo Visconti(2), Patricia S. Cuasnicú(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina. (2)Department of Cell Biology, University of Virginia, Charlottesville, USA.
vgdaros@dna.uba.ar

Diversas evidencias han sugerido la importancia del bicarbonato (B) para la capacitación y/o reacción acrosomal del espermatozoide. En este trabajo evaluamos la influencia del B en distintos parámetros asociados al funcionamiento del espermatozoide de rata. Para ello, espermatozoides epididimarios fueron incubados bajo condiciones capacitantes en medio con o sin B, evaluándose a diferentes tiempos: a) la fosforilación de proteínas en tirosina (por Western Blot), evento temprano de la capacitación, b) la migración de la proteína epididimaria DE desde la región dorsal al segmento ecuatorial (por inmunofluorescencia), evento asociado con el final de la capacitación y c) la capacidad fertilizante del espermatozoide, determinada por el % de ovocitos sin zona pellucida penetrados. La capacitación en medio con B produjo un aumento tiempo-dependiente en el patrón de fosforilación de proteínas, no observado en los espermatozoides incubados en medio sin B. Bajo estas últimas condiciones, los espermatozoides mostraron % significativamente menores tanto en la migración de DE (27 vs 44, $p < 0.05$) como en la penetración de ovocitos (0 vs. 84; $p < 0.001$). Los efectos observados en los tres parámetros fueron revertidos luego del agregado de B a espermatozoides previamente incubados en ausencia del anión. Estos resultados indican la importancia del B para la ocurrencia de eventos tempranos y tardíos de la capacitación, con el consecuente efecto sobre la capacidad fertilizante del espermatozoide.

358. La IL-1beta modula los niveles de glutatión total y lipoperoxidación en el CL de rata. Alejandra Estévez(1), Teresita Tognetti(1), Alicia B. Motta(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos - CONICET
alestevez@yahoo.com

La regresión luteal se caracteriza por una disminución en los niveles séricos de progesterona, infiltración de células del sistema inmune con producción de IL-1beta y especies reactivas del oxígeno. Objetivo: estudiar si la IL-1beta afecta alguno de los parámetros oxidativos (glutatión y lipoperoxidación) en el CL. Modelo Animal: Se utilizó el modelo de la rata pseudopreñada, administrando 15UI PMSG/rata para inducir un CL funcional por 9±1 día. Cultivos: ovarios de ratas en fase media y final del desa-

rollo luteal cultivados con/sin IL-1beta (15,25,35ng/ml) a distintos tiempos (1,4,8,21hs). Se ensayó el contenido de glutatión total (Tietze et al) en sobrenadante de cultivo y el índice de lipoperoxidación (TBARs, Beuge et Aust) en tejido. Resultados: el contenido de glutatión aumenta con el tiempo de incubación, siendo significativo a 8hs y máximo a 21hs (1h=5.4±0.3; 8hs=9.2±1.5; 21hs=19.2±2.2microM/grtejido). La IL-1beta aumenta significativamente y en forma dosis dependiente, los niveles de glutatión, sólo a 21 hs (control=17.6±1.5; 25ng/ml=23.2±2.3; 35ng/ml = 26.0±1.4 microM/grtejido). Por otra parte, el índice de lipoperoxidación resultó mayor en la fase final. La IL-1beta disminuye los TBARs sólo en ovarios en fase media (día 5 control=21.0±3.9; 25ng/ml = 15.0±2.1; día 9 control=38.5±5.5; 25ng/ml=32.7±4.1 nmoIMDA/grtejido). Conclusiones: durante la fase media del desarrollo luteal, la IL-1beta podría comportarse como molécula protectora, ya que aumenta el contenido de glutatión y disminuye TBARs

359. Producción de IFNg e IL-4 por linfocitos estimulados con medio condicionado de placenta humana (MCPH) provenientes de mujeres en el momento del parto. Cecilia R. Greco(1), María F. Cuello(1), Mirta A. Koncurat(2), Ramiro A. Martínez(3), Adriana B. Vivas(3).

(1)Departamento de Microbiología e Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto (2)Área de Microscopía Electrónica. Universidad Nacional de Río Cuarto (3)Departamento de Anatomía Animal. Universidad Nacional de Río Cuarto
mailto:cgreco@exa.unrc.edu.ar

Con el modelo de estimulación linfocitaria in vitro demostramos que durante la gestación humana, particularmente en el período peri-implantacional, se favorece el desarrollo de respuestas tipo Th2. También observamos que en el momento del parto hay una disminución de linfocitos CD8+ y CD56+. El objetivo del presente estudio fue determinar en el momento del parto la producción de IL-4 e IFNg, por linfocitos estimulados con extractos placentarios como medida indirecta de activación de las subpoblaciones Th1 y Th2 respectivamente. Se purificaron linfocitos de sangre periférica de mujeres en el momento del parto, normales (n=5) y de mujeres nulíparas (n=6). Las células se cultivaron sin y con 10% de MCPH durante 120 hs a 37°C. Se cuantificaron en los sobrenadantes IL-4 e IFNg por ELISA utilizando equipos comerciales. En los sobrenadantes de linfocitos de las mujeres en parto, la IL-4 estaba ligeramente aumentada en los cultivos con 10% de MCPH (p<0,05). No aparecieron diferencias significativas en los niveles de IFNg en los cultivos sin y con 10% de MCPH (x= 34,08 ± 2,28 pg/ml vs 40,91 ± 6,26 pg/ml respectivamente); produciéndose lo contrario en los sobrenadantes de cultivos linfocitarios de nulíparas con MCPH. Estos resultados muestran que en el momento del parto, existiría una modulación bidireccional entre ambas citoquinas lo que produciría un balance en las poblaciones Th1 y Th2, mostrando una interacción entre los sistemas inmune y reproductivo materno.

360. Presencia de IFN gama en extractos placentarios humanos y porcinos. Mirta A. Koncurat(1), Ramiro A. Martínez(2), Cecilia M. Escribano(2), Adriana B. Vivas(2), Cecilia R. Greco(3).

(1)Departamento Patología Animal. Universidad Nacional de Río Cuarto. (2)Departamento Anatomía Animal. Universidad Nacional de Río Cuarto. (3)Departamento de Microbiología e Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto.
mkoncurat@ayv.unrc.edu.ar

La gestación en la mujer y el ratón es un fenómeno tipo Th2, no habiéndose demostrado esto en otras especies. El objetivo de este trabajo fue dosar IFNg en extractos placentarios humanos a término y porcinos provenientes de diferentes períodos gestacionales. Se determinó por ELISA la presencia de IFNg en sobrenadantes de cultivo de células placentarias humanas y placentarias fetales porcinas a término y de 28, 50 y 70 días de

gestación; sueros y homogenatos placentarios porcinos fetales de esos mismos períodos gestacionales y sueros de machos y hembras no preñadas. Encontramos valores altos de IFNg en sobrenadantes de cultivo de células placentarias porcinas correspondientes al comienzo (1.817±845 pg/ml) y al final de la preñez (3.424,50±877,51 pg/ml), no hallándolo en extractos placentarios humanos a término (36,35±8 pg/ml). En homogenatos placentarios porcinos, que reflejarían la interfase feto-placentaria, los niveles de IFNg fueron: 639±46 pg/ml a los 28 días de gestación y 1.678±638,51 pg/ml al final de la preñez. En conclusión, en la interfase feto-placentaria la concentración de IFNg estaría regulada siendo su presencia necesaria tanto al inicio como al final de la gestación, fenómenos que se atribuirían a la placenta porcina fetal que sería la responsable de la síntesis del IFNg. Además, la existencia de IFNg en la placenta porcina a lo largo de la preñez indicaría que en esta especie la gestación no sería un fenómeno tipo Th2, como acontece en la mujer y el ratón.

361. Proteínas 'tipo caltrin' de plasma seminal humano. Purificación y propiedades de una forma molecular de 15 kDa. Carlos E. Coronel(1), Anahí A. Franchi(1).

(1)Cátedra de Química Biológica, FCFEYN, FCM, Universidad Nacional de Córdoba.
mailto: afranchi@biomed.uncor.edu.ar

Previamente informamos la inmunodetección, en plasma seminal humano (PSh), de dos proteínas de 15 y 34 kDa que reaccionaban con anticuerpos anti-caltrin (calcium transport inhibitor) II de cobayo. A fin de estudiar las propiedades moleculares y funcionales de estas proteínas, se inició la purificación usando técnicas clásicas. La proteína de 15 kDa fue purificada a homogeneidad a través de cromatografía de exclusión en Sephadex G-50, intercambio aniónico y, finalmente, exclusión molecular en HPLC. Con la proteína pura se generaron anticuerpos policlonales en conejo mediante inmunización clásica. El antisuero monoespecífico permitió detectar a la proteína de 15 kDa unida a la porción anterior y al segmento ecuatorial de la cabeza, como así también, a la nuca de los espermatozoides de eyaculados. Esta especificidad de 'binding' fue anteriormente observada con caltrin I de cobayo, rata y ratón. La secuencia de los primeros 35 residuos de aminoácidos mostró homología con las de beta-inhibina y PSP 94 (protatic secretory protein 94), y con el fragmento Ser21-Asp55 de la molécula precursora de MSP (beta-microseminoprotein) aislada de PSh (Kamada y col. BBActa 1388:101, 1998). Estas tres proteínas poseen la misma cadena polipeptídica pero el papel funcional de PSP 94 y MSP es aún desconocido. La inmunorreactividad con anticuerpos anti-caltrin y el 'binding' a la región acrosomal de los espermatozoides sugiere que la proteína de 15 kDa de PSh podría ser una forma molecular de caltrin

SIST. CARDIOVASCULAR II

362. Control de la Masa Ventricular Izquierda con bajas dosis de IECA y diurético en ratas Obesas Diabéticas (Zucker fafa.). Jorge E. Toblli(1), Carlos Rivas(1), Pablo Piorino(1), Patricia Pagano(1).

(1)Laboratorio de Medicina Experimental Hospital Alemán.
mailto:jtoblli@hospitalaleman.com

La hipertrofia ventricular izquierda es un hecho frecuente en diabetes y obesidad, asociándose a mayor morbimortalidad cardiovascular. Nuestro objetivo fue valorar la utilidad de bajas dosis de la asociación de IECA con diurético (perindopril (PER) + indapamida (IND) (PTX), mediante ecocardiografía, evaluando masa ventricular izquierda (MVI) y fracción de acortamiento (FA) en ratas obesas diabéticas Zucker (OZR). Machos OZR de 10 semanas, G1(n= 8)= OZR+PTX. y G2(n= 8)= OZR. Durante 6 meses G1 con PTX 1mg/kg/día por sonda. (ratio IND/PER 0,32), y G2 vehículo. Se efectuó ecocardiografía bidimensional (Eco) con equipo ATL HDI 3000 y transductor de 10 MHz. Al finalizar el

6to mes todos los animales se sacrificaron para evaluar peso cardíaco. Se utilizó test de Mann-Whitney con alfa = 0.05.

A los 6 meses (Media ± DS)	G1 OZR+PTX	G2 OZR	p
Peso corporal (PC) (g)	591,3 ± 55,2	551,5 ± 81,3	NS
Pres. Art. Sistólica (mmHg)	128,9 ± 4	150,3 ± 3,6	< 0,01
Glucemia en ayunas (mg/dl)	256,8 ± 11,2	267,7 ± 14	NS
Insulina/glucosa ratio	0,29 ± 0,06	0,38 ± 0,07	< 0,01
Eco: MVI /sup.Corp.(g/cm2) ECO	16,6 ± 3,2	25,5 ± 2,5	< 0,01
Eco: FA (%)	30,8 ± 3,8	20,9 ± 5,7	< 0,01
Peso cardíaco/ 100g PC	0,22 ± 0,03	0,38 ± 0,06	< 0,01

Estos resultados demuestran que el tratamiento con PTX modifica favorablemente la MVI y la FA en OZR mejorando a su vez parámetros metabólicos como sugiere la relación insulina/glucosa.

363. Asociación entre parasitemias cíclicas detectadas por la polimerasa de reacción en cadena (PCR) y la progresión hacia la miocardiopatía chagásica crónica (MChC). Ana L. Basquiera(1), Oscar A. Salomone(1), Adela Sembaj(2), Ana M. Aguerri(2), Mirta O. Omelianuk(1), Susana Guzmán(1), Carlota Carriazo(2), Tomás Caeiro(1), Roberto J. Madoery(1).

(1)Hospital Privado Centro Médico de Córdoba (2)Cátedra de Química Biológica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

OBJETIVO: Determinar si la detección de *Trypanosoma cruzi* (TC) circulante por PCR se asocia a un mayor riesgo de progresión hacia la miocardiopatía chagásica crónica. **MÉTODOS:** Desde diciembre de 1997 hasta junio de 2001 se estudiaron prospectivamente 40 pacientes consecutivos con 2 de 3 tests serológicos positivos contra el TC (26 mujeres, edad: 57±11 años). En todos los pacientes se realizó PCR, electrocardiograma y ecocardiograma en el momento del reclutamiento y al finalizar el seguimiento. La PCR se llevó a cabo amplificando una secuencia nuclear del parásito. Se definió progresión a la aparición de un nuevo defecto electrocardiográfico característico de la MChC y/o una nueva alteración de la función del ventrículo izquierdo (Vid mayor a 5.6 cm o FE menor a 50%). **RESULTADOS:** De 40 pacientes, 4 fallecieron en el transcurso del estudio. Los 36 pacientes restantes cumplieron un seguimiento de 957±209 días. 13 pacientes (36%) presentaron parasitemia en por lo menos una determinación durante el seguimiento. La progresión hacia el período crónico se detectó en 8 casos (22%) y fue significativamente más frecuente en el grupo con parasitemia respecto del grupo sin parasitemia (46 % vs 9% respectivamente; RR 5,3, 95% IC=1.4 a 20,8; p=0.01, Fisher Exact Test). **CONCLUSIÓN:** La detección de parasitemias por PCR se asocia a un mayor riesgo de desarrollar miocardiopatía, lo cual sugiere una preponderante participación del parásito en la fisiopatología del período crónico.

364. Efectos del ayuno sobre el corazón de rata sometido a isquemia global-reperfusión. María G. Marina Prendes(1), Alicia Varela(1), Gustavo Testoni(1), Christian M. Astudilla(1), Nancy Vázquez(1), Atilio Rastelli(1), Enrique A. Savino(1).

(1)Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA - Inst. de la Química y el Metabolismo del Fármaco, CONICET gmarina@huemul.ffyb.uba.ar

El ayuno previo, que activa el catabolismo lipídico, atenúa las alteraciones funcionales del corazón de rata sometido a isquemia global (I) - perfusión (RP). Se investigó si los efectos del ayuno se acompañan de cambios en la utilización del glucógeno, la producción de lactato y/o en la acumulación de metabolitos intermedios de los ácidos grasos endógenos. Con este fin se midió el contenido tisular de glucógeno, lactato, acil-CoA y acilcarnitina en corazones perfundidos Langendorff con Krebs con glucosa 10 mM provenientes de ratas alimentadas (AL) o ayunadas 24 h (AY) sometidas a I-RP. Luego de 25 min de estabilización el corazón

fue sometido a 25 min de I seguidos de 30 min de RP. La estadística se hizo con ANOVA de dos factores. A los 25 min de estabilización las AY mostraron un mayor contenido de glucógeno con respecto a las AL (532.1±66.77 vs 339.43±61.62 ug/100 mg seco, p<0.05, n=6). Al finalizar la I el contenido tisular de lactato fue menor en AY con respecto a AL (112,53±15 vs 153±14 umol/g seco, p<0.05, n=6) y el de acilCoA fue mayor (46,97±3,71 vs 32,62±1,62 umol/gh, p<0.01, n=6). Los contenidos de acilcarnitina (1750,15±60,50 umol/gh en AY vs 1517,17±107,7 en AL, n=6) y de glucógeno (69,23±16,62 ug/100 mg seco en AY y 78,94±21,08 en AL) fueron similares en ambos grupos. Los resultados sugieren que los efectos beneficiosos del ayuno podrían deberse a una menor actividad glucolítica y/o a una mayor disponibilidad de metabolitos anapleróticos del ciclo de Krebs.

365. Efecto de diferentes dosis de Endotelina-3 (ET-3) sobre la presión arterial, la función renal y la excreción de metabolitos del óxido nítrico (NO). Mónica P. Majowicz(1), Laura V. González Bosc(1), Cristina T. Arranz(2), Ana M. Balaszczuk(2), Norberto A. Vidal(1).

(1)Cátedra de Biología Celular e Histología. Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA. (2)Cátedra de Fisiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA. mailto:mmajow@ffyb.uba.ar

Estudiamos el efecto de la infusión de dos dosis de ET-3 sobre presión arterial media (PAM), función renal y excreción de metabolitos del NO (NOx) en ratas Wistar machos. Se dividieron en tres grupos: A (5ng/Kg/min ET-3), B (50 ng/Kg/min ET-3) y C (control: 0.05 ml/min de solución fisiológica [SF]); n=5. Se canuló: carótida para muestras de sangre y registros de PAM, vejiga para muestras de orina y yugulares para infundir SF, ET-3 y una solución de inulina 3% y paraaminohipurato 2%. Se infundió SF (0.05 ml/min) durante 45 min para estabilización. Se determinó diuresis, natriuresis, osmolaridad urinaria, volumen de filtrado glomerular, flujo sanguíneo renal, PAM, resistencia vascular renal y NOx a tiempo 0 (basal), 30 y 60 min. PAM aumentó significativamente en: (A)= 6.4% (30 min) y 9.9% (60 min); (B)= 7.4% (30 min) y 9.2% (60 min); (p<0.001 vs basal). RVR aumentó significativamente 36.7% en B a los 60 min (p<0.05 vs basal). NOx aumentó significativamente 7.4% en B a los 60 min (p<0.05 vs basal). Los demás parámetros no se modificaron ni en A ni en B. En C no hubo cambios. El aumento de PAM provocado por ambas dosis de ET-3 fue máximo a los 60 min. El aumento de la RVR podría deberse al efecto vasoconstrictor de la ET-3. En nuestras condiciones experimentales ninguna de las dosis estudiadas modificaron significativamente la función renal, quizá por una acción compensadora del NO. Estos resultados avalarían la hipótesis de una relación entre los sistemas del NO y las ETs.

366. Efectos del diazóxido (DZ) sobre el corazón de rata sometido a isquemia global - reperfusión. Gustavo Testoni(1), María G. Marina Prendes(1), Christian M. Astudilla(1), Nancy Vázquez(1), Atilio Rastelli(1), Enrique A. Savino(1), Alicia Varela(1).

(1)Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA - Inst. de la Química y el Metabolismo del Fármaco, CONICET gtest@huemul.ffyb.uba.ar

Se investigaron los efectos del DZ, abridor de los canales de potasio ATP-sensibles (K-ATP), sobre el corazón perfundido Langendorff de ratas alimentadas (AL) (n=7) o ayunadas 24 h (AY) (n=7) sometido a isquemia global (I)-reperfusión (RP). Luego de 25 min de estabilización se perfundió con DZ 30 uM o vehículo durante 10 min antes de comenzar la I (25 min) seguida de RP (30 min, en ausencia de DZ). La contractilidad se evaluó mediante la presión desarrollada (PD), las derivadas de contracción y relajación (±dP/dt) y la presión diastólica final (PDF). La estadística se hizo con ANOVA de 3 factores. Confirmando resultados anteriores el ayuno aceleró la recuperación postisquémica sin modificar la frecuencia de los latidos (PD: 75±12 vs 41±11% de

la P control, $p < 0,05$, +dP/dt: 67 ± 9 vs 46 ± 8 % de +dP/dt control, $p < 0,05$ a los 15 min de RP; PDF: 6 ± 2 vs 42 ± 12 % de la PD control, $p < 0,05$ a los 10 min de RP). El DZ (que no modificó los parámetros basales) disminuyó la recuperación postisquémica en ambos grupos (PD: 38 ± 11 vs 86 ± 11 %, $p < 0,01$ en AY y 30 ± 8 vs 68 ± 11 %, $p < 0,05$ en AL, +dP/dt: 42 ± 15 vs 84 ± 11 %, $p < 0,01$ en AY y 30 ± 9 vs 60 ± 10 %, $p < 0,05$ en AL, -dP/dt: 35 ± 11 vs 79 ± 11 %, $p < 0,05$ en AY y 31 ± 10 vs 66 ± 12 %, $p < 0,05$ en AL a los 20 min de RP). La frecuencia y la PDF no fueron modificadas por el DZ. Los resultados indican que el DZ, en una concentración que no afecta los canales K-ATP del sarcolema pero sí los mitocondriales exacerba la disfunción contráctil postisquémica en este modelo experimental.

367. Respuesta vascular a la Angiotensina II y cambios estructurales en vasos mesentéricos en la rata con sobrecarga dietaria de fructosa. Susana Cavallero(1), Marcos A. Mayer(2), Pablo F. Damiano(2), Adriana S. Donoso(3), Ana M. Puyó(3).

(1)Cát. de Biología Celular e Histología. Fac. de Farmacia y Bioquímica. (UBA) (2)Depto. de Fisiopatología. Fac. de Medicina. (UBA). (3)Cát. de Biología Celular e Histología. Fac. de Farmacia y Bioq. (UBA)
mailto: susanacavallero@yahoo.com.ar

Una dieta rica en fructosa produce en la rata aumento de la presión arterial (PA) y alteraciones metabólicas. En trabajos previos hallamos alteraciones en la contractilidad vascular en animales con sobrecarga crónica de fructosa. Nuestros objetivos fueron estudiar la reactividad vascular a distintos agonistas en el período agudo de tratamiento y la estructura de los pequeños vasos en la etapa crónica. Estudiamos ratas Sprague-Dowley macho: control (C) y fructosa (F: 10% P/V en el agua de bebida), a las 4 y 22 semanas (períodos agudo y crónico). Se registró la PA indirecta; en la etapa aguda (mmHg, F: 131 ± 2 vs. C: 123 ± 1 , $p < 0,01$, $n=11$ y 12) se realizó una curva dosis respuesta a la serotonina (5HT), se evaluó la respuesta a una dosis única de angiotensina II (All=5.10-8 M) y la relajación espontánea posterior en anillos de aorta torácica. Las respuestas contráctiles a 5HT y a All fueron similares en ambos grupos. La relajación espontánea fue menor en F (% a los 7,8,9 y 10 min: 54 ± 5 vs. 73 ± 3 ; 58 ± 6 vs. 84 ± 6 ; 61 ± 7 vs. 83 ± 6 ; y 60 ± 7 vs. 86 ± 5 , $p < 0,03$, $n=6$). En el período crónico (PA: mmHg, F: 132 ± 3 vs. C: 116 ± 3 , $p < 0,01$, $n=20$) los vasos del mesenterio de F mostraron un aumento en el área de la túnica media (μm^2 : 19393 ± 451 vs. 13903 ± 1037 , $p < 0,01$, $n=4$). Estos resultados sugieren que la reactividad vascular también está alterada en el período agudo. Los cambios estructurales de los vasos en el período crónico serían un cambio adaptativo en respuesta a la elevación de la PA.

368. El factor natriurético atrial (ANF) como factor pronóstico y marcador de compromiso miocárdico en la enfermedad de Chagas-Mazza. Jorge Scaglione(1), Ana M. Puyó(2), Sergio Auger(3), Susana Cavallero(2), Adriana S. Donoso(2), Horacio A. Dupuy(4), Belisario E. Fernández(5).

(1)Cát. de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. (2)Cát. de Biología Celular e Histología. Fac. de Farmacia y Bioq. (UBA) (3)Hospital D. Santojanni. Ciudad de Buenos Aires (4)Cát. de Fisiopatología. Fac. de Farmacia y Bioq. (UBA) (5)Cát. de Fisiopatología. Fac. de Facultad y Bioq. (UBA)
mailto: apuyo@ffy.uba.ar

El ANF plasmático está elevado en patologías con compromiso miocárdico. Nuestros objetivos fueron estudiarlo en distintos estadios de la enfermedad de Chagas a lo largo del tiempo y analizar su utilidad como factor pronóstico del desarrollo de miocardiopatía (MCP) y de sobrevida. Se estudiaron 32 pacientes chagásicos: 10 asintomáticos (CA), 10 con trastornos de conducción (TC) y 12 con MCP; 8 controles (C) y 16 pacientes no chagásicos: 5 con TC y 11 con MCP. Se determinó el ANF

plasmático por RIA (4 muestras/paciente: tiempos [t]= 0, 6, 18 y 24 meses). El ANF fue semejante en las primeras 3 muestras (chagásicos y no chagásicos). Agrupándose los pacientes con igual patología, el grupo con MCP presentaba niveles aumentados de ANF con respecto a los C y CA a t= 0, 6 y 18 meses ($X \pm SEM$, pg/ml: 89 ± 12 vs. 29 ± 2 , $p < 0,001$; 76 ± 9 vs. 37 ± 2 ; 112 ± 9 vs. 37 ± 3). A los 24 meses hubo diferencias entre los pacientes con CA y TC con respecto a C (47 ± 3 y 88 ± 15 vs. 25 ± 3 , $p < 0,005$); y entre las MCP y los demás grupos (271 ± 38 , $p < 0,001$ vs C y CA; y $p < 0,01$ vs TC). Los pacientes con concentraciones de ANF $> 0 = 112$ pg/ml ($t=0$) tuvieron el doble de mortalidad que los que presentaban niveles inferiores ($\chi^2 = 4,4$, $p < 0,03$; riesgo relativo = 2.167). En conclusión, el ANF es útil como marcador de compromiso hemodinámico gradual en pacientes con MCP; además los niveles aumentados del mismo serían un marcador precoz del desarrollo de MCP chagásica en los CA y de pronóstico adverso de sobrevida en MCP.

369. Regulación de las vías metabólicas de L-arginina en cardiomiocitos de ratón. María P. Aoki(1), Natalia L. Guiñazú(1), Laura Giordanengo(1), Diana T. Masih(2), Susana E. Gea(1).

(1)Inmunología, Dpto. Bioquímica Clínica. Facultad Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. (2)Parasitología, Dpto. Bioquímica Clínica. Fac. Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.
paoki@cmefcm.uncor.edu

El óxido nítrico (ON) es una molécula involucrada en laducción de señales que conducen a la proliferación o a la muerte celular. Se sintetiza a partir de L-arginina mediante ON sintetasa (NOS). Hay dos isoformas de arginasa (Tipo I y II) las cuales pueden regular negativamente la producción de ON disminuyendo las concentraciones intracelulares de arginina. Se ha demostrado que NOS y arginasa se regulan recíprocamente en macrófagos estimulados con citoquinas (CQ). El propósito de este trabajo fue estudiar la regulación de estas dos vías metabólicas en cardiomiocitos de ratones neonatos BALB/c. Cardiomiocitos (105 células/cm²) fueron cultivados en DMEM/ 10% SFB durante 24-72h y estimulados con: LPS (20ug/ml)/ IFNg (10U/ml), IL-4 (10U/ml) o mantenidos en DMEM (control). Se observó que LPS/IFNg disminuye el número de células viables e incrementa la producción de nitritos ($22,8 \pm 1,4$ uM vs $2,1 \pm 0,2$ uM) y de GM-CSF en sobrenadantes de cultivo. El nivel de TGF- β no presentó variaciones con respecto al control. Al estudiar en estas condiciones la expresión de NOS, arginasa I y II por inmunocitoquímica, se observó la inducción de NOS (iNOS) y arginasa II. Esta última, podría competir con la iNOS y regular negativamente la producción de ON. Por el contrario, el tratamiento con IL-4 indujo sólo la expresión de arginasa I. En resumen los resultados demuestran que las dos vías metabólicas de L-arginina regulan la producción de ON en cardiomiocitos estimulados con CQ.

370. Cambios en la Hormona Liberadora de Tirotrófina (TRH) cardíaca en el corazón hipertrofiado de la rata espontáneamente hipertensa (SHR). Mariano Schuman(1), Carlos J. Pirola(1), Azucena L. Alvarez(1), María S. Landa(1), Patricia I. Porto(1), Silvia I. García(1).

(1)Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari, UBA.
sigarcia@ciudad.com.ar

La TRH participa en el control cardiovascular. En las SHR la TRH central se encuentra hiperactivada. Existen evidencias acerca de un sistema de TRH cardíaco aunque aún se desconoce su función. La TRH además de hipertensora, sería un factor trófico y dado que las SHR presentan una marcada hipertrofia cardíaca evaluamos la TRH cardíaca en estos animales. Se utilizaron ratas SHR vs WKY adultas macho a las que se les determinó la presión arterial por el método pletismográfico de la cola (SHR: 165 ± 13 vs WKY: 115 ± 10) y se evaluó la hipertrofia ventricular como % del peso corazón/peso corporal

(SHR: 0.50±0.02 vs WKY: 0.27±0.01), n=6, p 0.04. La TRH fue cuantificada en aurículas (AU), ventrículo izquierdo (VI), derecho (VD) y septum (S), por RIA (pg/mg prot), n=6, posteriormente a su caracterización mediante cromatografía catiónica y HPLC. Los resultados mostraron una disminución significativa de TRH en las SHR en VI (2.7±0.3 vs 0.8±0.2) p<0.01 y en S (3.8±0.4 vs 1.9±0.2) p<0.04. No se observaron diferencias en VD mientras que en AU la TRH fue no detectable. Se observó una correlación significativa negativa entre grado de hipertrofia y contenido ventricular de TRH tomando ambas cepas (Spearman, R=-0.70, n=13, p<0.01). La presencia de TRH en las cavidades cardíacas y sus variaciones en un modelo de hipertrofia cardíaca e hipertensión como es la rata SHR sugiere que este sistema de TRH en el corazón podría estar participando del mecanismo fisiopatológico.

COMUNICACIONES EN POSTERS

ENDOCRINOLOGÍA V

- 371. Estrona y Estradiol activan la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) por mecanismos diferentes.** Virginia Masheimer(1), Josefina Mendiberri(2), Cristina Alvarez(2), Juana Sellés(2).

(1)Cátedra de Análisis Clínicos, Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. (2)Cátedra de Análisis Clínicos, Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur
mailto:massheim@uns.edu.ar

Previamente hemos demostrado que, en tejido aórtico de rata, el 17-beta-estradiol (E2) estimula en forma no genómica la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS). Estudiamos si la estrona (E1), segundo estrógeno con actividad biológica relevante, también participa en la modulación del metabolismo endotelial. Utilizando el ensayo de conversión de 3H-arginina en 3H-citrulina se determinó la producción de NO, en anillos de aorta de rata hembra tratados *in vitro* con E1. Se observó una marcada activación de la NOS luego de 5 min. de exposición a E1 10-8 y 10-10M (145 y 130 % respecto al control, P< 0,025). La especificidad de la reacción enzimática se confirmó al suprimir el estímulo con L-NAME 10-5 M (inhibidor irreversible de NOS). Se evaluó la participación del calcio en el mecanismo de activación de NOS por estrógenos. El incremento en NO inducido por E1 10-10M no fue alterado por la presencia del Egta 0.5 mM, quelante de Ca²⁺ (0.56 vs 1.23 s/Egta; 0.52 vs 1.18 c/Egta pmol /mg prot. control vs tratado). Contrariamente el aumento en NO inducido por E2 10-9 M fue completamente abolido por Egta (0.63 vs 1.19 s/Egta; 0.58 vs 0.56 c/Egta pmol /mg prot. control vs tratado). Idénticos resultados para ambas hormonas se obtuvieron al bloquear el influjo de calcio por canales con Verapamil 10uM. Estos resultados constituyen la primera evidencia de una acción directa de la estrona en tejido aórtico y sugieren que ambos estrógenos modulan la actividad NOS por mecanismos diferentes.

- 372. Participación de BMP-4 en la proliferación de tumores lactótrofos hipofisarios.** Damiana Giacomini(1), Marcelo Paez Pereda(2), Damián R. Refojo(1), Alberto Carbia Nagashima(1), Rodolfo Goya(3), Malcolm Low(4), Gunter Stalla(2), Florian Holsboer(2), Eduardo Arzt(1).

(1)Lab. de Fisiología y Biología Molecular. FCEN-UBA. (2)Max-Planck Institute, Alemania. (3)Universidad de La Plata, Argentina. (4)Vollum Institute, USA.
mailto:dpgiac@bg.fcen.uba.ar

No se conocen en detalle los mecanismos que originan los tumores hipofisarios. Utilizando la técnica de differential display-PCR observamos que la expresión de noggin, un antagonista de los factores de la familia de las Proteínas Morfogénicas de Hueso (BMP), se encuentra reducida en prolactinomas generados espontáneamente en ratones knock-out para el receptor de

dopamina (D2KO), al compararlos con hipófisis de ratones salvajes. Por RT-PCR y Western Blot encontramos sobreexpresados los niveles de BMP-4 y smad-4 (transductor de señales de BMP-4) en los prolactinomas D2KO, al igual que en las hipófisis tumorales de ratas Fisher tratadas crónicamente con estrógenos. Estrógenos (10⁻⁷ M) estimulan los niveles de BMP-4/smاد-4 en la línea tumoral lactosomatotrofa GH3 y este efecto se bloquea con el agregado del anti-estrógenos ICI (10⁻⁶M). Estudiamos la proliferación de GH3 frente a BMP-4 (50-200ng/ml) y observamos un aumento (76%-223%) de la proliferación, que es inhibido con noggin. Por otro lado clones estables GH3 smad dominante negativo no presentan dicha respuesta proliferativa. Analizamos la capacidad de éstos clones de generar tumores *in vivo* al ser inyectados en ratones nude, observando una disminución en el crecimiento de los tumores al compararlos con los generados por clones con el vector vacío (n=7 c/grupo, 100-680 mm³ vs 700-2600 mm³). Estos resultados demuestran que BMP-4/smاد-4 tienen un rol importante en el mecanismo que regula el crecimiento de los prolactinomas.

- 373. Efecto de modulación *in vivo* de la hormona de crecimiento recombinante humana (HCrh) en cartilago de ratas.** Leandro Sarrió(1), Graciela B. García(2), Alejandra I. Martínez(3), Sara Feldman(4).

(1)Cat. Quim. Biolog. Fac. Cs Médicas, Univ Nac. Rosario (2)Cat. Morfol. Fac. Cs. Bioq. y Farmac., Univ Nac Rosario (3)Cat. Morfol., Fac. Cs. Bioq. y Farmac., Univ Nac Rosario (4)Cat. Quim Biolog. Fac. Cs. Médicas, Univ Nac. Rosario
sfeldman@arnet.com.ar

Si bien existen evidencias de que la HC regularía el crecimiento de los huesos largos, sus efectos a nivel de expresión de proteínas no están bien dilucidados. Dado que el crecimiento del esqueleto requiere de la diferenciación de los condrocitos y la neovascularización del cartilago: se decidió estudiar el efecto de HCrh en la potencial expresión de osteocalcina en el cartilago de un modelo experimental de ratas de la línea Sprague dawley, hipofisectomizadas a las 4 semanas de edad. Se dividieron en tres grupos (n= 8): pertenecientes a Grupo I y II recibieron durante 8 semanas dosis diarias subcutáneas de 150 y 30 mUI/día/rata, respectivamente, de HCrh; grupo III recibieron dosis placebo. Técnicas inmunohistoquímicas desarrolladas con IgG α - región N-terminal de la osteocalcina (NH₂-LNGLGAPYPDPLEPHRC-COOH, obtenidas en conejo), realizadas sobre cortes histológicos, mostraron incrementos en lo que respecta a la expresión de osteocalcina en cartilagos de las tibias de los animales del grupo I, respecto a los del grupo II y III, así como II respecto a III. Se sabe que la osteocalcina es producida por células osteoblásticas y secretada a la matriz ósea. Nuestros resultados muestran que la expresión de osteocalcina en el cartilago estaría regulada *in vivo* por HCrh, lo que podría relacionarse con los procesos de diferenciación de los condrocitos hacia células formadoras de hueso así como tener un rol en los procesos de mineralización.

- 374. Estrés neurogénico y endotóxico: efecto sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en hipotálamo y glándula adrenal de la rata.** Claudia Mohn(1), Camila Scorticati(1), Alejandro Lomniczi(1), Mario Perelló(2), Eduardo Spinedi(2), Jose Antunes Rodrigues(3), Valeria Rettori(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos-CONICET (2)Instituto Multidisciplinario de Biología Celular. CONICET- CICPBA (3)Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina, Riberão Preto, Brasil.
claumohn@yahoo.com

Tanto el estrés neurogénico (EN) como el endotóxico (EE) modifican la ACTH y corticosterona (B) plasmáticas. Nuestro objetivo fue determinar si el EN repetitivo modificaría la respuesta al EE. Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho adultas en 4

grupos (n=8). Control (C) no sometido al EN o EE. Estresado por inmovilización repetitiva (ENR), 2hs/día por 5 días. Inyectado con LPS (5mg/kg) (EE) 5 hs previas al sacrificio. ENR+EE: ratas ENR + EE el 5to día. Se determinó ACTH (IRMA), B (RIA), TNFa (ELISA) y NO3 (Quimioluminiscencia) plasmática. Se midió la actividad de la NOS (14C-arginina) en hipotálamo medio basal (HMB) y glándula adrenal (GA). El ENR disminuyó la actividad de la NOS en HMB (C=129,6±2,1 pmol NO/HMB/10min; ENR=114,4±2,5) y en GA (C=14,5±1,2 pmol NO/mg prot/10 min; ENR=10,2±0,7)(p<0,01). El LPS aumentó la NOS en ambos tejidos (HMB: EE=138,7±2,1; ENR+EE=150,3±5,9) (Adrenal: EE=19,5±1,6; ENR+EE=19,6±1,5)(p<0,001). Los NO3 aumentaron con el EE (C=17,2±1,1 mM; EE=283,1±16; EE+ENR=276±11,4) (p<0,001) y no se modificaron con el ENR. La ACTH no se modificó con ENR y aumentó con EE (C=8,9±0,8 pg/ml; EE=85,6±9,3; EE+ENR=107,7±10,9)(p<0,001) mientras que para B no fue significativo. El TNFalfa aumentó con EE y ENR+EE (C= 4,9±1 pg/ml; EE=258,6±49,2; EN+EE=289,4±24,9) (p<0,001). El ENR disminuye la actividad de la NOS en HMB y GA sin alterar el aumento inducido por LPS. El ENR no modula el NO3, ACTH o TNFalfa plasmáticos inducidos por el EE agudo.

375. Acción de anandamida (AEA) sobre la secreción de LH y PRL en ratas hembras ovariectomizadas tratadas con estrógenos. Camila Scorticati(1), Claudia Mohn(2), Alejandro Lomniczi(2), Samuel McCann(3), Valeria Rettori(2).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. CEFYBO-CONICET (2)Estudios Farmacológicos y Botánicos. CEFYBO-CONICET (3)Pennington Biomedical Research Center, Baton Rouge. LSA. USA. mailto:cscorti@ffyb.uba.ar

Se ha demostrado la presencia y síntesis de endocannabinoides así como de sus receptores canabinoides CB1 en el SNC y pituitaria anterior (PA). Dado que la actividad de la PA se encuentra bajo la influencia de hormonas esteroideas sexuales circulantes, nuestro objetivo fue determinar la acción de AEA administrada intra cerebro ventricular (icv) sobre los niveles de la hormona luteinizante (LH) y prolactina (PRL) plasmáticos en ratas hembras ovariectomizadas (OVX). Se usaron ratas Sprague Dawley hembras canuladas en el tercer ventrículo cerebral (3V) y en la vena yugular. Se administró 17-β-Estradiol (10ug/rata s.c.) 48hs previas al día del experimento. Se usaron 3 grupos experimentales de 6 animales cada uno inyectadas icv. Control (C): vehículo; AEA: AEA 20ng/2ul y animales inyectados con AM 251 (antagonista CB1)+AEA: AM 251 icv (200 ng/2ul) 30min previas a la inyección de AEA icv. Se tomaron muestras de sangre cada 30min durante 150min y se determinó LH y PRL plasmática por RIA. AEA provocó un aumento significativo en los niveles de LH (Area (ng/ml): C=32,7±5,9; AEA=63,1±11) revirtiéndose con AM251 (Area: AM251+AEA= 20,9±6,1)(p<0,05) ANOVA-Newman-Keuls post-test. La PRL respondió de forma similar (Area (ng/ml): C=51,8±9,1; AEA=114,1±23,4; AM251+AEA= 52,4±18,3)(p<0,05). Podemos concluir que la AEA estimula el eje gonadotrófico y lactotrófico vía receptores CB1 en ratas hembras OVX estrogenizadas.

376. El Factor de Necrosis Tumoral -alfa (TNF) disminuye la secreción de prolactina por aumento de la actividad dopaminérgica. Andrea De Laurentiis(1), Carla Caruso(1), Daniel Pisera(1), Claudia Mohn(2), Valeria Rettori(2), Adriana Seilicovich(1).

(1)Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA (2)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET mailto:adyseili@fmed.uba.ar

Las citoquinas inducidas durante un proceso infeccioso afectan la secreción de hormonas hipofisarias. Dado que la dopamina (DA) es el principal factor inhibitorio de la secreción de prolactina, hemos examinado el efecto in vivo e in vitro de TNF sobre la actividad dopaminérgica hipotálamo-hipofisaria. La administración

i.c.v. de TNF (10 ug/rata) disminuyó los niveles de prolactina sérica determinada por RIA (C: 4.20 ± 2.38 ng/ml; TNF: 1.78 ± 0.10, p<0.05). El TNF no modificó la relación DOPAC/DA (determinada por HPLC) en hipotálamo medio basal (HMB) o pituitaria posterior (PP). Sin embargo, aumentó la concentración de DA (C: 0.632 ± 0.166 ng/mg proteína; TNF: 1.536 ± 0.194, p<0.05) y DOPAC (C: 0.084 ± 0.051 ng/mg proteína; TNF: 0.272 ± 0.044, p<0.05) en la pituitaria anterior. El TNF (50 ng/ml) produjo un aumento no significativo de la liberación basal in vitro de DA desde HMB (C: 0.353 ± 0.071 ng/mg proteína; TNF: 0.536 ± 0.106). En la PP, el TNF aumentó la liberación de DA basal (C:0.578 ± 0.034; TNF: 0.796 ± 0.072, p<0.05) y evocada por K+ (C: 0.939 ± 0.125; TNF: 1.472 ± 0.174, p<0.05). Estos resultados sugieren que el TNF podría inhibir la secreción de prolactina por un aumento en la pituitaria anterior de la concentración de dopamina, posiblemente proveniente del lóbulo neural. El TNF podría mediar los efectos de la endotoxemia sobre la secreción de prolactina.

377. Modificaciones ontogénicas en el efecto del sistema GABAérgico sobre la liberación de aminoácidos excitatorios en el hipotálamo. Pablo Scacchi(1), Silvia Carbone(1), Berta Szwarcfarb(1), Dora Rondina(1), Roxana Reynoso(2), Osvaldo Ponzo(2), Jaime Moguilevsky(1).

(1)Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA; CONICET (2)Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA. mailto:scacchi@mail.retina.ar

Durante la maduración sexual existiría una interrelación entre los sistemas GABAérgico y de aminoácidos excitatorios, sobre la secreción de gonadotropinas. Se estudió el efecto del AOAA (ácido aminoacético), sobre la liberación hipotalámica de GABA, glutámico (GLU) y aspártico (ASP). Se incubaron fragmentos de hipotálamo medio basal (n=10) de ratas hembras prepúberes (6 y 15 días) y peripúberes (30 días) inyectadas con solución salina o AOAA (20 mg/kg i.p., 90 min. antes del sacrificio) en medio de Earle's y luego de un período de preincubación y descarte, se midieron los neurotransmisores (pmol/100 ul de medio/30 min.) por HPLC. La liberación de GABA, aumentó significativamente (p<0.001) en animales pre y peripúberes (6 días: 8.6±0.3 vs. 32.1±1.8; 15 días: 36.2±5.2 vs. 150.1±10.2; 30 días: 13.2±3.1 vs. 33.3±1.5). Dicho incremento fue acompañado por un aumento a los 15 días, de GLU (p<0.001) (73.2±5.2 vs.598.4±30.1) y de ASP (p<0.01) (180.2±10.2 vs. 298.4±20.1) y una significativa disminución (p<0.001) a los 6 y 30 días (6 días: GLU: 325.5±30.3 vs. 150.1±16.1; ASP: 432.5±30.3 vs.216.1±5.1; 30 días: GLU:129.2±8.1 vs. 54.8±6.1; ASP: 322.2±15.1 vs. 198.8±8.4). Estos resultados indican que existen cambios ontogénicos en el efecto del sistema GABAérgico, sobre la liberación hipotalámica de aminoácidos excitatorios, que podrían estar relacionados con la acción estimulante del GABA a los 15 días e inhibitoria a los 6 y 30 días sobre la secreción de gonadotropinas.

378. Efecto de leptina sobre la actividad de la oxido nítrico sintasa y ácido gamma amino butirico en el desarrollo sexual. Roxana Reynoso(1), Valeria Rettori(2), Pablo Scacchi(3), Claudia Mohn(2), Berta Szwarcfarb(3), Silvia Carbone(3), Jaime Moguilevsky(3).

(1)Departamento de Fisiología-Facultad de Medicina-UBA (2)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos - CONICET (3)Departamento de Fisiología-Facultad de Medicina-UBA-CONICET

Trabajos previos han demostrado que el sistema GABAérgico y el óxido nítrico están involucrados en los mecanismos neuroendócrinos del desarrollo puberal. Ambos neurotransmisores estimulan la liberación de gonadotropinas en animales prepúberes de 15 días de edad. Existen evidencias de que ambos sistemas podrían ser regulados por la leptina la hormona del tejido adiposo involucrada en el desarrollo puberal. En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración de leptina sobre: a) Activi-

dad de óxido nítrico sintasa hipotalámica (NOS) por el método de Snyder mod., en ratas hembra prepúberes (10 y 15 días) y peripúberes (30 días) tratadas con leptina (dosis: 30 ug/kg 2 veces por día durante 3 días y 1 dosis una hora antes del sacrificio); b) Contenido de GABA en homogenato de hipotálamo anterior y medio basal, por HPLC. En los animales de 15 días, la actividad de NOS (pmol NO/10 min./HMB) fue significativamente mayor ($p < 0.001$): $33,53 \pm 0,4$ que a los 10 días: $11,21 \pm 1,90$ y a los 30 días: $11,63 \pm 1,1$. No se detectaron variaciones significativas en el contenido de GABA hipotalámico (nmol/mg/proteína): 10 días: $2,0 \pm 0,1$; 15 días: $2,8 \pm 0,2$; 30 días: $2,5 \pm 0,25$. Estos resultados sugieren que la leptina estimula la actividad de NOS a los 15 días y este efecto sería independiente del sistema gabaérgico.

379. Efecto del fotoperíodo sobre la FSH hipofisaria en el hámster dorado adulto. Karina S. Zitta(1), Ricardo S. Calandra(2).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Instituto de Biología y Medicina Experimental, Fac. Ciencias Exactas, UNLP
mailto:kzitta@dna.uba.ar

Los niveles séricos de FSH en el Hámster dorado descienden de manera drástica entre 12 a 14 semanas de exposición a fotoperíodo corto (FC, 6 horas luz y 18 horas oscuridad) comparados con los animales que estaban en fotoperíodos de luz normal (FN, 14 horas de luz y 10 de oscuridad). En el presente trabajo se estudian en hamsters adultos expuestos durante distintas semanas a FC (8, 12, 16, 18, 22 y 28 semanas) y en FN, las concentraciones séricas de FSH (ng/ml) y los niveles de FSH por hipófisis (ng/HP). Resultados: las concentraciones séricas de los animales sometidos a FN: $4,44 \pm 0,31^*$, FC8: $4,10 \pm 0,37^*$, FC12: $3,69 \pm 0,24^*$, FC16: $3,80 \pm 0,21^*$, FC18: $6,32 \pm 0,69^{**}$, FC22: $12,91 \pm 1,94^{***}$ y FC28: $7,39 \pm 0,78^{***}$ (**, *** $p < 0.05$ comparado con FN) y las concentraciones hipofisarias de los animales sometidos a FN: $182,7 \pm 16,7\#$, FC8: $59,5 \pm 5,7\#$; FC12: $75 \pm 6,5\#$, FC16: $181,5 \pm 20,5\#$, FC18: $203 \pm 18\#$, FC22: $1650 \pm 145,6\#\#\#$ y FC28: $380 \pm 24,5\#\#\#$ ($\#\#\# p < 0.05$ comparado con FN). En síntesis, estos resultados indican que la hipófisis de hámster en FC libera la FSH tisular acumulada y a partir de las 16 semanas en fotoperíodo corto y a pesar de persistir el mismo, la reactivación espontánea posibilita a la hipófisis la síntesis de FSH.

380. Angiotensin II (All) induced Map-Kinase activation in normal and hyperplastic pituitary cells. Cecilia Suárez(1), Arturo González Iglesias(1), Alejandro Mladovan(1), Graciela Díaz-Torga(1), Isabel García Tornadú(1), Alberto Baldi(1), Damasia Becu de Villalobos(1).

(1)IBYME-CONICET. Obligado 2490. Bs. As.
mailto:csuarez@dna.uba.ar

Hemos demostrado que el efecto de la All se altera en la hiperplasia hipofisaria inducida por estrógenos (Am.J.Physiol 277:455:1999, Am.J.Physiol 280:462:2001). Las vías de transducción de señales difieren, y aumenta el subreceptor AT2. Ya que la fosforilación de MAP kinasas p42/44 participa en los efectos proliferativos de la All en varios tejidos, evaluamos esta vía de señalización en células hipofisarias normales, y en el fenotipo de hiperplasia hipofisaria. Células hipofisarias de rata en cultivo fueron estimuladas por All (sola o en combinación con antagonistas), lisadas y las MAP K fueron cuantificadas por Western blot usando anticuerpos contra MAP K fosforilada, y MAP K total. Se realizaron curvas de concentración y de tiempo respuesta. La All incrementó significativamente la fosforilación de MAP K, con una CE50 de $5.3 \pm 2.1 \times 10^{-9}$ M. Dicho efecto fue bloqueado por PD98059, inhibidor de MEK1/2, y fue menor en magnitud al inducido por EGF (10ng/ml) usado como control positivo. El efecto fue máximo a los 5 min ($p = 0.0083$), y a los 15 min había desaparecido. La activación de MAP K por All 10^{-7} M fue bloqueada por el antagonista AT1 losartán (10^{-5} M), y no por el antagonista AT2 PD123319 (10^{-5} M). Esta es la primera demostración de la activación de MAP K por All en hipófisis. Los efectos

fueron significativamente menores en células hipofisarias hiperplásicas indicando que esta vía de señalización también se desensibiliza en la hiperplasia. Con el apoyo de ANPCYT y CONICET

381. Análisis de la expresión de homólogos de IGF-I humano como reguladores de la excreción de agua y sales minerales en insectos. Jorge R. Ronderos(1), Alejo Scarano(1), Fernando L. Riccillo(1), María I. Bracamonte(2), María S. Santini(1).

(1)Cát. Histol. y Embriol. «B» - Cát. Histol. y Embriol. Animal (FCM-FCNyM) UNLP (2)Cát. Histol. y Embriol. «B» (FCM) UNLP
jrondero@museo.fcnyml.unlp.edu.ar

Las diferentes especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) poseen un gran impacto en nuestra sociedad como vectores de enfermedades (ej. dengue). Uno de los problemas que debe enfrentar un organismo es el mantenimiento de su equilibrio osmótico. En el caso de los mosquitos, cuyas larvas se desarrollan en ambientes acuáticos limitados y sometidos a cambios repentinos de salinidad, la respuesta de su medio interno a los cambios de la presión osmótica ambiental debe ser rápida y efectiva. El conocimiento de la fisiología y de los mecanismos básicos de regulación en insectos resulta de vital importancia para el desarrollo de metodologías alternativas de control. El objetivo del presente trabajo es analizar la expresión y probable función de péptidos homólogos de IGF-I humano (regulador de la diuresis en mamíferos) en la regulación de la excreción en larvas de mosquitos. El análisis mediante inmunohistoquímica realizado en larvas del mosquito *Culex pipiens* L. sugiere la presencia de IGF-I en tejidos asociados a la excreción. El sometimiento de larvas del IV estadio de mosquitos a agua destilada durante 10 min mostró una caída significativa en los niveles de inmunoreactividad (ELISA) para hIGF-I. La reposición de agua corriente luego del shock osmótico mostró que los valores tienden a equipararse con los controles (agua corriente) luego de 3 hs, demostrando una reversibilidad del efecto lo que sugiere un probable rol fisiológico del o los péptidos involucrados.

382. Desarrollo de un tumor experimental de ovario. Análisis inmunocitoquímico. Eleonora M. Soriano(1), S. Fritz(2), C. Beyer(2), D. B. Hales(2), Artur Mayerhofer(2), Carlos Libertun(1), Victoria A.R. Lux-Lantos(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Anatomisches Institut, Universität München
mailto:esoriane@dna.uba.ar

El tumor ovárico intraesplénico (T) crece en respuesta a LH y FSH. Caracterizamos inmunocitoquímicamente el crecimiento y la capacidad secretora de T. En cortes de T de 1-2 meses de evolución se determinó: expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), presencia de células apoptóticas por el método de TUNEL, expresión de las proteínas: connexin 43 (Cx43), que forma parte de las uniones estrechas y también la proteína de la regulación esteroideogénica aguda (StAR), aromatas (Ar) y la proteína de 25kDa asociada a sinaptosomas (SNAP-25), como parámetros de capacidad secretora. Se estudió la expresión de los mRNA de StAR, SNAP-25, Cx43 (RT-PCR) y subunidades de inhibina (Northern). PCNA fue positivo principalmente en células de granulosa y fue negativo en folículos luteinizados. T mostró ausencia de células apoptóticas. Cx43 se encontró en folículos en desarrollo y fue negativa en los luteinizados. StAR se encontró sólo en folículos luteinizados y células tecaes. Ar fue muy intensa en la granulosa y también positiva en células lúteas. Los mRNA de inhibina, Cx43, StAR y SNAP-25 se demostraron en tumores de 1, 3 y 7 meses de evolución. Estos resultados demuestran que T crece a expensas de la hipertrofia y proliferación de células de granulosa y la ausencia de apoptosis. La expresión de Cx43, StAR, SNAP-25 y Ar se encuentran en general conservadas aunque con algunas diferencias respecto del ovario normal. Con apoyo de CONICET-UBA-Ministerio de Salud de la Nación

FARMACOLOGÍA I

383. Protección miocárdica de Perindopril más Indapamida en Hipertensión y Diabetes. Jorge E. Toblli(1), Graciela DeRosa(2), Gabriel Cao(3), Pablo Piorno(1).

(1)Laboratorio de Medicina Experimental Hospital Alemán.
(2)Departamento de Patología. Hospital de Clínicas. (3)Departamento de Patología. Hospital de Clínicas.
mailto:jtoblli@hospitalaleman.com

Hipertensión y Diabetes tipo 2 asociadas incrementan la morbimortalidad cardiovascular. Nuestro objetivo fue valorar utilidad de bajas dosis de un IECA + diurético (perindopril (PER) + indapamida (IND) (PTX) en la protección del daño estructural, mediante análisis morfométrico (AM) miocárdico e inmunohistoquímico (IHQ) en ratas Zucker (OZR). Machos OZR de 10 semanas, G1(n= 8)= OZR+PTX. y G2(n= 8)= OZR. Durante 6 meses G1 con PTX 1mg/kg/día por sonda. (ratio IND/PER 0,32), y G2 vehículo. Se efectuó AM del miocardio e IHQ con monoclonal anti-TGFb1.

Al 6to. mes (media ± DS)	G1 OZR+PTX	G2 OZR	p
Peso corporal (PC) (g)	591,3 ± 55,2	551,5 ± 81,3	NS
Pres. Art. Sistólica (mmHg)	128,9 ± 4	150,3 ± 3,6	< 0,01
Glucemia en ayunas (mg/dl)	256,8 ± 11,2	267,7 ± 14	NS
Peso cardíaco/ 100g PC	0,22 ± 0,03	0,38 ± 0,06	< 0,01
No. Fibras/área	48 ± 1,5	20 ± 2,5	< 0,01
Diámetro por fibra (u)	21,1 ± 0,5	32 ± 3,1	< 0,01
No. capilares/ área	30,5 ± 3,1	9,5 ± 1,6	< 0,01
No. fibras / No. capilares	1,58 ± 0,1	2,19 ± 0,3	< 0,01
TGFb1 intersticial	0,53 ± 0,15	3,37 ± 0,67	< 0,01
TGFb1 pared vascular	1,46 ± 0,38	7,52 ± 0,54	< 0,01

PTX controló significativamente la hipertrofia cardíaca, mejoró la relación entre No. de fibras y capilares, disminuyendo además la expresión de TGFb1 involucrado en la fibrosis miocárdica.

384. El disulfiram es un potente inhibidor de topoisomerasas. Juan S. Yakisich(1), Ake Siden(2), Peter Eneroth(1), Mabel Cruz(1).

(1)Clinical Research Center, Karolinska Institute, Novum, Huddinge University Hospital, Sweden (2)Department of Neurology, Karolinska Institute, Huddinge University Hospital, Sweden
mailto:yakisich@excite.com

El disulfiram, una droga que reacciona con grupos tioles, ha sido usada para el tratamiento del alcoholismo por mas de 40 años debido a su capacidad de inhibir la enzima alcohol deshidrogenasa hepática. Esta droga además tiene varios efectos sobre la síntesis de ADN y la proliferación celular cuyo mecanismo de acción aún no está aclarado. En este trabajo, se estudió el efecto inhibitorio del disulfiram sobre la actividad de las enzimas topoisomerasas I y II, enzimas claves para la replicación y la transcripción, mediante la inhibición de la relajación del plásmido pBR322. El disulfiram (1-100 uM) inhibió la actividad de la topoisomerasa I y II de una manera concentración dependiente (IC50 = 42±8 y 30±9 uM, respectivamente). El ditiotreitól (1 mM) previno el efecto inhibitorio del disulfiram sobre ambas topoisomerasas indicando que la participación de grupos tioles es importante para la actividad enzimática de las topoisomerasas. Estos hallazgos podrían explicar numerosos efectos relacionados con la toxicidad del disulfiram y sugieren que las sustancias que reaccionan con grupos tioles pueden constituir una nueva clase de inhibidores de topoisomerasas.

385. Participación de óxido nítrico sintasa (nos), fosfolipasa c (plc) y arginasa en la señalización muscarínica de líneas de adenocarcinomas mamarios murinos. Alejandro J. Español(1), Lilia E. Davel(1), María A. Jansis(1), Eugenia S. de Lustig(1), María E. Sales(1).

(1)Instituto de Oncología Angel H. Roffo

Previamente caracterizamos la expresión de receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) por ensayos de saturación con el antagonista muscarínico tritiado bencilato de quinuclidinilo (3H-QNB) en líneas de adenocarcinomas mamarios murinos LM3 y LM2. Por ensayos de competición demostramos que la unión de 3H-QNB es desplazada en orden decreciente por los antagonistas atropina (AT)>AF-DX116>4-DAMP>pirenzepina, lo que indica una expresión mayoritaria del subtipo M2 en ambas líneas celulares. En LM3 la estimulación con el agonista muscarínico carbacol (CARB) (10-7 M) incrementó la producción basal de NO (NO2- nM/106 cél.) (659±41) (n=4) en un 45% (959±50) (n=4). Dicho efecto fue inhibido por L-NMMA (10-4 M) AT y 4-DAMP (10-5M) y demostramos expresión de la isoforma neuronal de NOS por Western blot. Mientras que también observamos un incremento en la producción de inositol trifosfato (IP3) (pmol/mg prot) (0.551±0.05) por CARB (1,351±0.11). Dicho efecto fue bloqueado por NCDC, AT y AF-DX 116 (10-5 M). En LM2, la misma dosis del agonista estimuló drásticamente la producción y liberación basal de prostaglandina E2 (pg/106 cél.) (Basal: 96,0±8,7; CARB: 1712,4±143,3) (n=3). Es probable que la activación muscarínica en LM3 module su crecimiento y diseminación metastásica a través de la producción de NO, mientras que en LM2, los altos niveles del prostanoides actuarían inmunosuprimiendo al hospedador y favoreciendo el crecimiento del tumor.

386. Alteraciones en la actividad y expresión de óxido nítrico sintetasa en parótidas de ratones NOD. Florencia Rosignoli(1), Claudia Pérez Leirós(1).

(1)Depto Química Biológica, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires-CONICET

Los ratones NOD desarrollan una respuesta autoinmune contra las glándulas salivales con pérdida progresiva de la función secretoria constituyendo un modelo útil para el estudio del Síndrome de Sjögren. En trabajos previos demostramos una disminución en la actividad basal de óxido nítrico sintetasa (NOS) en las glándulas submaxilares de ratones NOD y una falta de respuesta de NOS a la estimulación por péptido intestinal vasoactivo (VIP) y carbacol. Esta alteración estaba asociada a una menor expresión de la isoforma NOS I sin cambios en NOS II. En este trabajo ampliamos ese estudio a las parótidas y a las tres isoformas de NOS y su relación con la disfunción secretoria. Se midió la actividad de NOS en parótidas usando L-[U-14C]-arginina como sustrato en condiciones basales y estimuladas con carbacol y VIP, el flujo salival en respuesta a pilocarpina y VIP y la expresión de las tres isoformas de NOS por inmunoblotting. Usamos ratones BALB/c como controles. Observamos una disminución significativa de la actividad basal de NOS (BALB/c: 852±78, NOD: 431 ±50 pmol/g, p<0.05) con falta de respuesta al VIP y una disminución significativa en el flujo salival estimulado por VIP (BALB/c: 46.9±3.32, NOD: 26.4±4.6 ul/min, p<0.05). Además observamos cambios en la expresión de NOS I pero no de NOS II y III en parótidas de NOD con respecto a los controles. Concluimos que las parótidas de ratones NOD presentan alteraciones en la NOS que podrían contribuir a la disfunción secretoria.

387. Farmacocinética de aniones orgánicos en ratas con calcificación arterial en evolución. Nora B. Quaglia(1), Anabel Brandoni(2), Adriana M. Torres(3).

(1)Farmacología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario (2)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (3)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Univ. Nacional de Rosario. CONICET
mailto:adtorres@fbiof.unr.edu.ar

Se han observado modificaciones en las depuraciones de aniones orgánicos en ratas con calcinosis arterial. El objetivo de este trabajo fue evaluar la farmacocinética de Sulfanilamida (SA, anión orgánico modelo) en ratas Wistar macho con calcificación arterial en evolución. Se usaron ratas controles (C,n=10) y ratas

estudiadas a los 5 (T5; n=7); 10 (T10, n=7) y 20 días (T20, n=6) después de una sobredosis de Vitamina D3. Se determinaron: contenido de Calcio en aorta (Caa), Presión Arterial Sistólica (PAS) y los parámetros farmacocinéticos de SA(4 mg/kg p.c.; i.v.). Resultados: (media \pm SEM, test de ANOVA, Newman-Keuls, p<0,05: a vs C, b vs T5, c vs T10): Caa (umol/g): C = 26.27 \pm 2.43; T5 = 35.71 \pm 5.63a,c; T10 = 50.16 \pm 4.99a,b; T20 = 75.87 \pm 4.83a,b,c. PAS (mmHg): C = 96.2 \pm 3.1; T5 = 158 \pm 7a; T10 = 136 \pm 8a; T20 = 161 \pm 13a. Clearance (CISA ml/ min/100g, p.c.): C = 2.66 \pm 0.17; T5 = 3.19 \pm 0.10a; T10 = 3.14 \pm 0.10a; T20 = 2.39 \pm 0.08b,c. Constante de velocidad de eliminación, K10 min⁻¹): C = 0.15 \pm 0.01; T5 = 0.15 \pm 0.01; T10 = 0.12 \pm 0.005; T20 = 0.13 \pm 0.01. Volumen de Distribución Central (VdC, ml/100g p.c.): C = 18.41 \pm 0.66; T5 = 22.26 \pm 1.51; T10 = 27.03 \pm 1.02a,b; T20 = 18.53 \pm 0.94c. Volumen de Distribución Periférico (VdP, ml/100g p.c.): C = 25.76 \pm 1.14; T5 = 21.96 \pm 2.10; T10 = 18.21 \pm 0.73a; T20 = 19.76 \pm 1.42a. Las variaciones de VdP y VdC podrían deberse a modificaciones hemodinámicas. El aumento de VdC podría explicar el incremento de CISA.

388. Efecto de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) sobre la producción de óxido nítrico en el cerebelo de rata.

María L. Ribeiro(1), Diego G. Ogando(1), Antonio L. De Los Santos(2), Manuel Martí(2), Guillermo Di Girolamo(2), Ana M. Franchi(1), Mariana Farina(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (2)FACULTAD DE MEDICINA (Universidad de Buenos Aires) cefybo@velocom.com.ar

Existen numerosas evidencias que muestran al NO involucrado en los procesos inflamatorios, incluyendo los reumáticos y artríticos. El efecto de los AINES sobre la síntesis de NO tiene implicancias importantes ya que la inhibición de la iNOS (NO sintasa inducible) podría prevenir la neurodegeneración producida por el sistema inmune disminuyendo la síntesis de los radicales libres de NO. La NOS puede ser inducida en muchas células, y esta producción aumentada de NO podría tener un papel importante en la patogénesis de los desórdenes degenerativos del cerebro. En este trabajo se estudia el efecto in vivo de tres AINES (Clonixinato de Lisina CL, indometacina y meloxicam) sobre la producción de NO en cerebelo de rata, cuantificada por la técnica de Snyder modificada. El LPS (5mg/kg) in vivo incrementó la producción de NO (C: 24691 + 3743 cpm/100mg p.h., LPS: 43716 + 3489). La co-administración de indometacina en dosis de 2,5 y 5 mg/kg no modificó el efecto del LPS y sólo una dosis de 10 mg/kg fue capaz de abolir el aumento producido por la endotoxina. También las dosis de 10, 20 y 40 mg/kg de CL y las de 5 y 10 mg/kg de meloxicam bloquearon el incremento en la síntesis de NO. Los estudios por western blot muestran que la expresión de iNOS y nNOS es incrementada por LPS y que esto es inhibido por todas las dosis de CL estudiadas (10, 20 y 40mg/kg). Estos resultados muestran la acción inhibitoria de tres AINES sobre la síntesis de NO de cerebelo.

389. El lipopolisacárido (LPS) y el estradiol (E) inducen la expresión de la nNOS y la iNOS. Maximiliano Cella(1), Diego G. Ogando(1), Mariana Farina(1), María L. Ribeiro(1), Ana M. Franchi(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos mailto:makicella@yahoo.com

El óxido nítrico (NO) es una molécula inestable pero polifuncional que media en numerosos procesos fisiológicos como la neurotransmisión, la regulación inmune, la motilidad del músculo liso. En el útero participa en la implantación y en el mantenimiento de la quiescencia durante la preñez. En este trabajo se estudia si el LPS y el E regulan la producción de NO en el útero de rata ovariectomizada. El LPS (5mg/kg) aumentó la síntesis de NO (cuantificada por la técnica de Snyder modificada) en un 104 %. La preincubación con L-NAME (600 uM) inhibió en un 64% este incremento, mientras que la Aminoguanidina (500uM), inhibidor específico de la iNOS(NOS inducible) lo hizo en un 52%. La

Espermidina (3uM), inhibidor específico de la nNOS (NOS neuronal) fue capaz de disminuir en un 57% el efecto del LPS. El E (1ug/rata) aumentó la producción de NO en un 103%, hecho que fue inhibido parcialmente por AG (66%) y por Espermidina (32%). Para determinar las isoenzimas involucradas en el efecto de LPS y E, se realizaron inmunoblots utilizando anticuerpos específicos anti eNOS (NOS endotelial), iNOS y nNOS. El útero de rata ovariectomizada expresa eNOS e iNOS. Pero tanto el tratamiento con LPS como con E indujo la expresión de nNOS y aumentó la de iNOS. No se modificó la expresión de la eNOS. Estos resultados sugieren que el LPS y el E aumentan la síntesis de NO en el útero de rata, aumentando las isoformas iNOS y nNOS.

390. Interacción entre el dermatán sulfato y el complejo de activación de la vía clásica del complemento humano.

Graciela C. Calabrese(1), Mariela M. Marani(1), Fabiana Alberto(2), Eduardo F. Recondo(3), Marta E. Fernandez de Recondo(1).

(1)Cát. de Biología Celular e Histología.Fac. de Farm. y Bioqca. Universidad de Buenos Aires (2)Academia Nacional de Medicina (3)Dpto de Química Biológica. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires

Las cadenas polisacáridas del Dermátan Sulfato (DS) se están unidas a un esqueleto proteico constituyendo proteoglicanos: decorina, biglicano y trombomodulina; actúa como anticoagulante inhibiendo a la trombina (T) (directamente a través del Cofactor II de la Heparina o indirectamente por activación de la Proteína C. Nuestro grupo ha descrito que bajo estrictas condiciones experimentales, la actividad anticoagulante y anticomplementaria de la heparina no fraccionada residen en la misma fracción del polisacárido. El objetivo del trabajo es caracterizar la interacción entre el DS y el primer complejo de activación del complemento humano(C1). El C1 se aisló del plasma humano por el método de Bing y se purificó por cromatografía de afinidad con IgG agarosa. Se utilizó DS de máxima pureza (Syntex). La unión entre ambas macromoléculas se midió por la turbidez desarrollada a 420 nm, en 1 hora a 37°C bajo condiciones controladas (pH, relación DS/C1, presencia de iones calcio y baja fuerza iónica). En todas las relaciones de DS/C1 estudiadas (1, 2, 5 y 10) en el precipitado de la interacción se separó una pequeña fracción de DS que oscila entre el 11.10 y 5.50%, significativamente diferentes (P<0.01, test de Dunnett). Sobre estas fracciones se midió la actividad anti T a través del sustrato cromogénico. Los resultados preliminares parecen indicar que igual que con la Concanavalina A, la interacción del DS con el C1 selecciona una pequeña fracción con propiedades particulares.

HEMATOLOGÍA III

391. Tratamiento con láser de He-Ne en un modelo artropatía experimental. Vilma Campana(1), Mónica Moya(1), Antonio Gavotto(1), Juan Simes(1), Luis Spitale(1), Noemí Miler(1), José A. Palma(1).

(1)Cátedra de Física Biomédica, Universidad Nacional de Córdoba mailto: monicamoya@hotmail.com

Entre los cristales endógenos con capacidad para provocar lesiones intraarticulares se encuentra el urato monosódico que desencadenan una cascada que, en último término, causa la destrucción del cartilago mediada por las citoquinas e indirectamente la elevación de los niveles de fibrinógeno, el que fue determinado en ratas con artropatía inducida por uratos para evaluar el efecto antiinflamatorio del láser de He-Ne y por estudio anatomopatológico (AP). En un 1º grupo se inyectó uratos en ambas articulaciones de los miembros posteriores. El 2º grupo: control. En el 3º grupo se trató con Láser sobre las articulaciones inyectadas con uratos. Se observa que existe un incremento

estadísticamente significativo ($p < 0.001$) de los niveles de fibrinógeno (434.48 ± 18.38 mg/100ml) en el grupo inyectado con uratos comparando con el grupo control (201.9 ± 9.58 mg/100 ml) y la misma diferencia existe entre el grupo inyectado con uratos con las posteriormente tratadas con láser de He-Ne (227.23 ± 11.96 mg/100 ml). Sin existir diferencia estadísticamente significativa comparando el grupo control con el inyectado con uratos y tratadas con láser de He-Ne. Se observó en la AP del grupo inyectado sin tratamiento reacción inflamatoria crónica y en el grupo tratado un marcado proceso regresivo. El tratamiento con Láser de He-Ne en artritis experimental por uratos tendría efecto antiinflamatorio evaluado por los niveles de fibrinógeno e involución de los cambios histológicos.

392. Repoblación eritropoyética en ratones hipóxicos aplasiados transplantados con médula osea normocitémica. Susana M. Mide(1), Cristina Barceló(1), Rosa M. Alippi(1).

(1)Cátedra de Fisiología-Facultad de Odontología, U.B.A. smide@ciudad.com.ar

La eritropoyesis de hipoxia tiene un patrón definido que ya fue presentado. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del trasplante de médula osea normocitémica (M.O.N) sobre la producción de células identificables morfológicamente de la serie roja (C.I.M.S.R.) en animales hipóxicos aplasiados. Ratones CF1, adultos, hembras, fueron subdivididos en 4 grupos: Control no irradiado (C.N.), Hipóxico no irradiado (C.deHx), Control irradiado (C.I.) e Hipóxico irradiado (Hx.I.). 20 ratones fueron tratados 18 días con Hx. discontinua (Cámara de altura), 10 se sacrificaron 14 días después (C.de Hx.). Los restantes más 10 controles se irradiaron (800 rads) y se les inyectó 1.4×10^6 células de M.O.N. isogénica, sacrificándose a los 14 días post-trasplante. Se efectuó hematimetría, recuento celular de M.O.Total (M.O.T.=Células de femur x 17) y de Bazo(B), esplenogramas y mielogramas. De estos datos se obtuvieron C.I.M.S.R. totales (M.O.T.+B). Los resultados fueron: Reticulocitos $\times mm^3$ (x 103): C.N.: 125 ± 10 vs. C.I.: 244 ± 17 vs. Hx.I.: 24 ± 3 ($p < 0.001$). En C.de Hx. vs Hx.I.: n.s. En C.I.M.S.R. totales $\times 10^6$ se halló: C.N. 84.4 ± 3.5 vs. C.I.: 113.3 ± 2.2 vs. Hx.I.: 19.4 ± 0.54 ($p < 0.001$). Entre C.de Hx. vs Hx.I. en B. fue n.s. En M.O. no habían C.I.M.S.R. La irradiación letal y el trasplante de M.O.N. en ratones hipóxicos no modifican el patrón de eritropoyesis de hipoxia.

393. Relación entre fragmentos de Fibronectina (Fn) de alta afinidad por la heparina y la proteasa que cliva al factor von Willebrand (VWF). Ana C. Kempfer(1), Gonzalo A. Carballo(2), Cristina E. Farías(1), María R. Silaf(2), María M. Amaral(3), Adriana I. Woods(4), María A. Lazzari(4).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. CONICET. Fund. Roemmers (2)Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. Fund. Roemmers (3)Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. (4)Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. CONICET kempfer@hematologia.anm.edu.ar

Hemos descrito que fragmentos (F) proteolíticos de Fn (producida en nuestro laboratorio) de afinidad por la heparina degradan al factor von Willebrand (VWF) purificado en forma similar a la VWF. En este trabajo utilizamos, a partir de Fn comercial, estos mismos F (afinidad creciente), (FI= $175 \mu\text{g}$, FII= $26 \mu\text{g}$, FIII= $5 \mu\text{g}$) y F comerciales de 30 kD ($150 \mu\text{g}$) con afinidad a heparina, F de 40 kD ($150 \mu\text{g}$) a gelatina, F de 70 kD ($150 \mu\text{g}$) heparina y gelatina, anticuerpo a-VWF (420 μg , IgG de un paciente con PTT no familiar), VWF (3.5 μg) parcialmente purificada. A estas muestras (184 μL), cuya proteasa se activa con BaCl_2 (0.02M), se le agrega VWF purificado (1.84 μg). Para exponer el sitio proteolítico del VWF se realiza una diálisis con urea (1.5M) durante 19h a 37°C. El % de la actividad proteásica sobre el VWF de las muestras respecto a la de un pool de plasmas normales se evalúa midiendo el

enlace del VWF al colágeno. El VWF:Ag se mide por ELISA. El rango del % de la actividad proteásica (n=3) fue: FI= [0-12], FII= [77-102], FIII= [20-43], F 30kD=[85-102], F45kD= [4-24], Fg 70kD= [0-30], VWF= [73-102], FI+a-VWF=[12-50], FII+a-VWF=[3-12], F 30kD +a-VWF=[90-100], Fg 45kD+a-VWF=[2-14], VWF+a-VWF=[0-10]. El VWF:Ag de los productos de diálisis no indicó adsorción. Los resultados indican: que los F de alta afinidad por la heparina y no por la gelatina tienen actividad proteásica y que el FII contiene la VWF ó a una sustancia con sitios antigénicos similares.

394. Proteasa que cliva al factor von Willebrand (VWF) en el embarazo. Cristina E. Farías(1), Ana C. Kempfer(1), Analía G. Sánchez Luceros(1), Gonzalo A. Carballo(2), María J. Salviú(2), María R. Silaf(2), María A. Lazzari(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. CONICET (2)Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina.

La deficiencia de la proteasa que cliva al VWF (VWF) se asocia con la presencia de multímeros extragrandes del VWF en plasma, los cuales pueden producir agregación plaquetaria en la microcirculación. El embarazo es una condición fisiológica en la cual los niveles de VWF aumentan con el avance del mismo. En este trabajo determinamos la actividad de la VWF de estas embarazadas del primer y tercer trimestre. El propósito del mismo es establecer la relación entre la VWF y el VWF:Ag al principio y al final de la gesta. La actividad de la VWF de estas muestras plasmáticas la evaluamos respecto a diluciones de un pool normal. Se desarrolla una diálisis con urea (expone el sitio proteolítico) de VWF purificado agregado a los plasmas previamente incubados con BaCl_2 para activar a la VWF. El efecto de la VWF sobre el VWF se evalúa por el ensayo de unión de VWF a colágeno. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Embarazadas del primer trimestre (n=6): % de VWF= 90 ± 20 , %VWF:Ag= 121 ± 57 . Embarazadas del tercer trimestre (n=8) % VWF= 65 ± 18 , %VWF:Ag= 216 ± 112 . Concluimos que el % VWF de las embarazadas del tercer trimestre es significativamente menor ($p=0.03$) al % de VWF de las embarazadas del primer trimestre, mientras que existe un aumento significativo del VWF:Ag ($p < 0.05$). El cociente entre las medias de VWF/VWF:Ag (0.74 vs 0.30) disminuye con la gesta, lo que muestra una tendencia a afirmar una correlación entre los parámetros.

395. Genotipificación de la inversión del intrón 22 del gen del factor VIII de coagulación mediante PCR de larga distancia. Carlos D. De Brasi(1), Liliana C. Rossetti(1), Irene B. Larripa(2).

(1)Inst. de Invest. Hematológicas, Academia Nacional de Medicina (2)Inst. de Invest. Hematológicas, Academia Nacional de Medicina ibl@hematologia.anm.edu.ar

La hemofilia A (HA) es una enfermedad hemorrágica, hereditaria, ligada al sexo caracterizada por déficit en el FVIII de coagulación. El 40-45% de las HA severas son causadas por la inversión del intrón 22 (Inv22). A pesar del reporte de un método basado en PCR de larga distancia (LD PCR) de un solo tubo (Liu et al, 1998, Blood 92:1458-9) para detectar la Inv22 en lugar del lento y laborioso Southern blot; dificultades de tipo práctico asociadas a la resolución de amplicones de parecida longitud e intensidad desbalanceada (10, 11 y 12 Kb), impiden el reemplazo confiable de un método por otro. Este reporte describe el diseño y validación de una modificación del método de Liu et al para estudiar la Inv22, que incluye la genotipificación en tubos separados de los alelos normal (12 Kb) y mutado (11 Kb) de cada muestra. La presencia o ausencia de señal específica permite determinar los 3 posibles genotipos: Inv22 [+], [-] o [+/-]. Las condiciones de reacción y termociclado fueron optimizadas. El método propuesto fue validado en un experimento a ciegas comparando los resultados de 11 muestras previamente genotipificadas por

Southern blot, obteniéndose una perfecta correlación. Estos resultados indican la confiabilidad del método y nos permiten proponerlo para ser incorporado a la rutina de diagnóstico molecular en HA severa.

396. Modificación de la red de fibrina por Homocisteína. Ana M. Lauricella(1), Irene Quintana(1), María M. Castañón(1), Lucía Kordich(1).

(1)Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.
mailto:lht@qb.fcen.uba.ar

La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para la trombosis. Para evaluar el efecto de la homocisteína (Hcy) y compuestos relacionados, sobre la fibrinofibrinólisis, se obtuvieron redes de fibrina plasmática en presencia de 0.3 mM de Hcy; Cisteína (Cis); 2-Mercaptoetanol (2-ME) y Homocisteína (Hcis); control: PBS. Se registró la Absorbancia a 450nm vs tiempo. Las redes de fibrina fueron observadas por microscopía electrónica. Se evaluaron los siguientes parámetros: número de fibras por campo, ancho y largo de las fibras (micrómetros). Las mediciones, expresadas como mediana y rango, fueron comparadas vs el control por el método de Mann Whitney (* = p < 0.05).

	N° Fib/cpo	Ancho	Largo
PBS	30 (27 - 32)	0.31 (0.17-0.41)	1.02 (0.56-2.31)
Hcy	34 (32 - 36)*	0.33 (0.18 - 0.69)*	0.56 (0.23-1.89)*
Cis	31 (24 - 32)	0.36 (0.2 - 0.84)*	0.83 (0.38-1.96)*
2-ME	16 (6 - 24)*	0.31 (0.13 - 0.99)	1.04 (0.15-3.39)
Hcis	23 (16-36)	0.31 (0.18-0.66)	0.92(0.46-2.85)

Conclusiones: La fibrina generada en presencia de Hcy es compacta, con fibras cortas y gruesas. El grupo trol de la Hcy, y no el de los otros compuestos sulfurados, estaría involucrado en ese efecto. Estos datos contribuirían a esclarecer el mecanismo trombogénico de la hiperhomocisteinemia.

397. Evaluación de MTHFR variante termolabil (MTHFRTL), protrombina 20210A (FII20210A) y vleiiden (FVL) en pacientes con trombosis venosas (TV) y arteriales (TA). María J. Salviú(1), Alicia N. Blanco(1), María V. Nadal(1), Patricia Casais(1), María F. Alberto(1), Laura C. Gennari(1), Silvia H. Grosso(1), Emilse Bermejo(1), María A. Lazzari(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina

Evaluamos la presencia de alteraciones trombofílicas en pacientes con TV (31) y TA (13), analizándose MTHFRTL, FII20210A, FVL, inhibidor lúpico (IL), anticardiolipinas (ACA), homocisteína (hcy), respuesta fibrinolítica a la isquemia y tPA/PAI. La mayoría de los pacientes mostraron al menos un defecto (TV:29/31; TA:12/13). Dividimos los pacientes según el genotipo-MTHFRTL. TV: 11 normales (NMTHFR) y 20 homo/heterocigotas (MTHFRTL); TA:4 NMTHFR y 9 MTHFRTL. Detallamos a continuación las alteraciones observadas(n). TV-MTHFRTL(20): FV(1), FII20210A(0), IL/ACA(10), Fibrinólisis⁻(2), hcy-(>15mM)(18), mediahcy25,37±17,03. TV-NMTHFR(11): FV(3), FII20210A(3), IL/ACA(1), Fibrinólisis⁻(1), hcy-(6/9), mediahcy15,46±5,36. Observamos mayor prevalencia de IL/ACA (p:0,0260) enTV-MTHFRTL y de FII20210A (0,0367) o FII20210 y/o FVL (0,0132) en TV-NMTHFR. TA-MTHFRTL(9): FV(1), FII20210A(0), IL/ACA(3), Fibrinólisis⁻(0), hcy-(7/7), media hcy 20,93±4,51. TA-MTHFR(4): FV(0), FII20210A(0), IL/ACA(2), Fibrinólisis⁻(1), hcy-(3), mediahcy16,48±6,05. No observamos diferencias (p>0,05) en la prevalencia de los diferentes defectos entre TA-MTHFRTL y TA-MTHFR. En pacientes con MTHFRTL (TV o TA) los niveles de hcy fueron más altos, sin alcanzar significación estadística. En TA la MTHFRTL no se asocia a ningún defecto en particular. En TV la MTHFRTL se asocia a la presencia de IL/ACA; en cambio, en ausencia de MTHFRTL se detecta la presencia de las otras anomalías moleculares, FVL y/o FII20210A.

398. Efecto de Ligaria cuneifolia (Lc) sobre la forma, deformabilidad y resistencia osmótica eritrocitaria. A. Dominighini(1), D. Crosetti(1), M. Ferrero(1), M. T. Ronco(2), M. Wagner(3), A. Gurni(3), C. Carnovale(2), A. Luquita(1).

(1)Cátedra de Biofísica, Fac. Cs. Médicas. UNR (2)Instituto de Fisiología Experimental, Fac. de Cs. Bioq. y Farm. UNR (3)Cát. de Farmacobotánica, Fac. de Cs. Farm. y Bioq. UBA

Anteriormente demostramos que el tratamiento de ratas con Lc, incrementa la viscosidad sanguínea y disminuye la deformabilidad eritrocitaria. Objetivo: analizar el efecto directo de Lc sobre la forma, deformabilidad y resistencia osmótica eritrocitaria. Método: A ratas Wistar machos adultas se les extrajo sangre anticoagulada por punción cardíaca. La sangre obtenida se fraccionó en Control (C) (n=5) y Tratada (T), a la cual se le agregó Lc concentración 2,5 mg% (T1) (n=5) o 5,5 mg%, (T2) (n=5), incubándose 30 minutos a 37°C. Resultados: Índice de rigidez (IR) (filtración a través de membranas nucleopore): C: 7,12 ± 1,08 ; T1: 14,09 ± 1,70* ; T2:18,59 ± 1,93* (*p<0,01 vs. C). Forma eritrocitaria (distinción de las formas por microscopía y cálculo del Índice Morfológico IM): C: -2,86 ± 0,12 ; T1: -3,61 ± 0,11* ; T2: -3,16 ± 0,10* (*p<0,02 vs. C). Resistencia osmótica (RO) (estimada por la pendiente B de la curva de hemólisis) expresada como la diferencia BC-BT fue para T1: 3,52 ± 0,75 y T2: 2,88 ± 1,00 (p< 0,05) implicando aumento de RO. Los índices hematimétricos: concentración de hemoglobina corpuscular media (CHbCM -C: 36,93 ± 1,50) y volumen corpuscular medio (VCM-C: 62,92 ± 2,50) no se modificaron. Conclusión: El efecto de Lc sobre el eritrocito produce un cambio de forma de discocito a esferoestomatocito (IM más negativo) que evidencia una interacción con la bicapa lipídica de la membrana. Este cambio explicaría el aumento observado en IR y en RO.

INFECTOLOGÍA I

399. Análisis de factores predictores de lesión y de riesgo trombogénico en ratones inoculados con dos cepas de T. cruzi. Juan Bustamante(1), Mónica B. Fantino(1), Walter H. Rivarola(1), Alicia R. Fernández(1), Julio E. Enders(1), José A. Palma(1), Patricia A. Paglini(1).

(1)Departamento de Fisiología y Física Biomédica fernandez@fcm.unc.edu.ar

El presente trabajo tiene como objetivo analizar comparativamente ratones infectados con dos cepas de T. cruzi, las modificaciones observadas en los valores de parasitemia, los registros electrocardiográficos, la estructura histológica, la afinidad y densidad de los receptores beta cardíacos y los niveles de fibrinógeno plasmático como parámetro de factor de riesgo. Se utilizaron ratones albinos suizos de 3 meses de edad tanto para el grupo inoculado con 50 tripomastigotes T. cruzi cepa Tulahuen (T) como para el grupo infectado con 50 parásitos/animal de la cepa Z/12 Argentina (Z) (obtenida de paciente crónico). Los datos obtenidos en la etapa aguda reflejan que la parasitemia del grupo T es mayor que la del grupo Z (p<0,01). Las alteraciones electrocardiográficas se expresan en un 35% en el grupo T y un 14% en el Z, esto se ve acompañado con una histopatología más severa en el primer grupo con respecto al segundo. La afinidad de los receptores beta cardíacos no mostró diferencias significativas entre ambos grupos, en cambio la densidad fue mayor en el grupo Z que en el grupo T (207, 64±8,16 y 78, 245±1,672 fmo/mg proteína) (p<0,001). En cuanto a los valores de fibrinógeno plasmático fueron superiores en el grupo T (311, 6±11,7 mg/dl) con respecto al Z (232±10 mg/dl) (p<0,001). Podríamos concluir que las lesiones producidas con la cepa Tulahuen generan una cardiopatía y un factor de riesgo trombogénico más severos que con la cepa Z12.

400. Detección de Adenovirus en Receptores de Células Periféricas Hematopoyéticas durante el Período Pretrasplante. Marcela S. Echavarría(1), Lilia Villamea(1), Fabian Herrera(1), Jorge Solimano(1), Pablo Bonvehí(1), Dardo Riveros(1), Roberto Cacchione(1), Gabriela Elbert(1), Guadalupe Carballal(1).

(1)Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC)
mailto:mechavarría@cemic.edu.ar

Para determinar la prevalencia de infección por adenovirus (AdV) en receptores de células periféricas hematopoyéticas se obtuvieron, previamente al trasplante, muestras de sangre (leucocitos) y orina de 23 pacientes con patología oncohematológica. El grupo control incluyó muestras de sangre de 15 adultos sanos. La detección de AdV se realizó por cultivo y PCR. De los 23 pacientes, 8 presentaron PCR positivas para AdV por PCR en leucocitos y 4 en orina. El AdV se recuperó por cultivo a partir de leucocitos en 3 pacientes y de orina en 2 pacientes. En 4 casos se observó positividad para AdV simultáneamente en sangre y orina. En el período pretrasplante un total de 11 pacientes tuvieron un resultado positivo para AdV en alguna muestra por uno de los métodos empleados. De ellos, 2 desarrollaron cistitis hemorrágica o neumonía (con etiología negativa para otro patógenos) luego del trasplante. Todas las muestras de individuos sanos fueron negativas para AdV por cultivo y PCR. En nuestro conocimiento, éste es el primer trabajo que evalúa la presencia de AdV por PCR en sangre y orina previamente al trasplante. La prevalencia de AdV fue de 35% (8/23) por PCR y de 13% (3/23) por cultivo. Estos datos sugieren que este grupo de pacientes inmunosuprimidos podrían reactivar el virus y estar en riesgo de desarrollar enfermedad por AdV.

401. Caracterización de la infección por el virus de la hepatitis C (HCV) en niños y su asociación con la infección materna. María I. Gismondi(1), Saúl Grinstein(1), María V. Priado(1).

(1)Laboratorio de Virología, Hospital de Niños R. Gutiérrez migismondi@yahoo.com.ar

La drogadicción endovenosa materna y la transmisión perinatal contribuyen de manera primordial a la infección por HCV en pediatría. Se estudiaron 44 niños de madres HCV+, las cuales eran el único factor de riesgo de infección para ellos. 13/44 resultaron + por RT-PCR anidada para HCV (10/13 hijos de madres HIV+). De los 31/44 niños HCV-, 22 eran hijos de madres HIV+. Se determinó el genotipo viral por RFLP de la región 5'NC. En 12/13 pacientes se halló el genotipo 1 (9/12 1a/c; 1/12 1b; 2/12 indeterminado) y en 1/13 2a/c. El genotipo se mantuvo constante durante el seguimiento (3-20 meses). Se estudiaron muestras de madres HCV+ de 16/44 niños (12/16 HIV+) que fueron el único factor de riesgo para la infección por HCV de sus hijos. 15/16 madres presentaron genotipo 1 y 1/16 3a/c/d/e. 9/16 hijos fueron HCV + por RT-PCR anidada y el genotipo viral coincidió en las parejas madre-hijo. Los valores de carga viral fueron variables tanto para los niños como para las madres, incluyendo aquellas HCV + de los niños HCV-. Se secuenció la región HVR-1 en muestras consecutivas de 3 niños, obtenidas con intervalos de entre 2 y 8 meses. 2 casos mostraron 100% de homología y 1 presentó mutaciones puntuales a lo largo del tiempo. La tasa de transmisión vertical de HCV no estuvo directamente relacionada con la coinfección materna con HIV. El genotipo viral predominante es el 1. La variabilidad nucleotídica del virus en períodos cortos es escasa o nula en los casos estudiados.

402. Detección de genoma del virus de Hepatitis C (HCV) en líneas B linfoblásticas (LCL-B) derivadas de pacientes HIV + coinfectados con HCV. Patricia Baré(1), Ivana Massud(1), Liliana E. Belmonte(1), Raúl Pérez Bianco(1), Miguel Tezanos Pinto(1), Marcelo Corti(2), María Marta Elizalde de Bracco(1), Beatriz Ruibal Ares(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas «Mariano R Castex». Academia Nacional de Medicina. (2)Fundación de la Hemofilia
pbare@hematologia.anm.edu.ar

Anteriormente, describimos un sistema de cultivo sin estimulación, de leucocitos mononucleares de pacientes HIV+ mediante el cual fue posible demostrar replicación de HIV en monocitos y macrófagos entre los días 7 y 25. En el 60% de los cultivos se obtuvieron LCL-B positivas para el virus de Epstein Barr a partir de los 30 días. Utilizando este método establecimos 20 LCL-B a partir de 12 pacientes coinfectados con HCV. Se realizaron mediciones de carga viral de RNA de HCV (CV-HCV) y de antígeno p24 de HIV en los sobrenadantes de estas líneas a distintos tiempos de cultivo. El promedio de CV-HCV fue de 25.700 copias/ml (4,41 log). Pudo detectarse RNA-HCV en sobrenadantes de hasta 6 meses por lo que se descarta la posibilidad de que el RNA detectado derive de los viriones provenientes del plasma adsorbidos a la superficie de células mononucleares periféricas (CMP). El establecimiento de las LCL-B positivas para RNA de HCV fue precedido por la presencia de p24 en los sobrenadantes de cultivos en concentración de 27 a 2300 pg/ml. En contraste, LCL-B negativas para RNA HCV fueron precedidas por cultivos con niveles bajos (<20) o indetectables de p24. Se observa una correlación positiva entre el Ag p24 del SN de cultivo (antes del día 35) y la CV HCV del sobrenadante de las LCL-B. Estos resultados sugieren que la replicación de HIV en las CMP de pacientes coinfectados HIV/HCV está involucrada en el establecimiento de la infección por HCV de las líneas B resultantes.

403. Relación de los parámetros de apoptosis in-vitro con la infección por el virus de influenza en humanos. Susana Mersich(1), Elsa Baumeister(2), Adrián Lewis(2), Diego Riva(3), Stella Cadario(2), Andrea Pontoriero(2), Vilma Savy(2).

(1)Lab. de Virología. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. (2)INEI-ANLIS Carlos G. Malbrán (3)Lab. de Virología. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.
mailto:susan_m@qb.fcen.uba.ar

Los virus de Influenza causan epidemias anuales siendo el Influenza A el más importante clínicamente. Dado que estos virus inducen apoptosis in-vitro, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar este fenómeno cuando se produce la infección con virus aislados de pacientes con diferentes características clínicas: el aislamiento T similar a A/Sydney/5/97 (H3N2) proveniente de un paciente con síndrome gripal y el NAC5 similar a A/New Caledonia 20/99 (H1N1)NC, proveniente de un paciente con neumonía viral. Una medida de la citotoxicidad de las cepas virales en células MDCK se hizo por el ensayo de láctico dehidrogenasa (LDH) enzima citosólica liberada por lisis al sobrenadante de células infectadas. Asimismo se detectó la presencia de los núcleos apoptóticos con el reactivo de Hoescht y se valoró la actividad de caspasa 3 (C-3), enzima efectora de la muerte celular programada. La cepa T resultó ser tan citotóxica como su prototipo vacunal A/Sydney de referencia y ambas de menor toxicidad que NAC5, pero produjo finalmente menor actividad de C-3. El aislamiento NAC5, exhibió la más alta citotoxicidad (2.5 veces la cepa prototipo NC) y produjo altos valores de C-3. En contraste las respectivas producciones de virus no demostraron correlaciones con C-3 o LDH. Se concluye que los parámetros de apoptosis estudiados son representativos de la severidad de la enfermedad.

404. Amplificación renal de virus polioma. Silvina Simula(1), Edurne Escudero(2), Norberto Sanjuan(1).

(1)Departamento de microbiología, Facultad de Medicina, UBA. (2)Departamento de microbiología, Facultad de Medicina, UBA.
mailto:patoexpe@fmed.uba.ar

Es sabido que el riñón es un sitio preferencial de amplificación de virus, sin que hasta el presente se haya explicado su eli-

minación por la orina sin proteinuria concomitante ni lesiones detectables. En este trabajo se estudió la cinética y algunas características de la replicación de poliomavirus en el riñón. Se emplearon ratones neonatos C3H BiDa que fueron inoculados con 500.000 ufp de polioma. Un grupo fue infectado con la cepa altamente oncogénica PTA mientras que el segundo lo fue con la cepa pobremente oncogénica RA. Ambas cepas difieren sólo en un aminoácido de la proteína mayor de la cápside. Cada 2 días se sacrificaron 3-4 ratones, hasta 25 días post-infección (pi). Se tomaron muestras de orina y de sangre, y la presencia de polioma fue estudiada por western blot contra VP-1 y aislamiento viral. En los mismos animales se estudió la presencia del virus en el tejido renal por inmunocitoquímica y microscopía electrónica. En los infectados con PTA la viruria comenzó desde el día 10 pi y se extendió hasta el día 23. En ningún caso se detectó viremia previa a la viruria. El virus se encontró en los túbulos renales, especialmente los colectores sin producir lesiones necróticas, y ubicado en los núcleos y especialmente en vacuolas intracitoplásmicas. No se detectó replicación renal de RA. Esto sugiere la presencia de un proceso similar al de transcritos y una alta selectividad en la eliminación renal de polioma.

405. Efecto de la reinfección con Trypanosoma cruzi (Tc) en ratas. Héctor H. Berra(1), Maximiliano Tamae(2), Stella M. Pezzotto(2), Silvia S. Revelli(2).

(1)*Cátedra Fisiología Humana. Facultad Ciencias Médicas. Universidad Nacional Rosario.* (2)*Instituto Inmunología. Facultad Ciencias Médicas. Universidad Nacional Rosario.* hbonar@hotmail.com

La reinfección es una variable involucrada en la evolución de la enfermedad de Chagas y en el desarrollo de la miocarditis crónica chagásica. El objetivo de este trabajo fue analizar sus efectos en un modelo en ratas 'I' (Medicina 1980, 40: 69). Se utilizaron para tal fin 5 animales controles (GC), 5 infectados al destete con 1 millón de tripomastigotes de la cepa Tulahuén (GI) y 5 reinfectados (GR) a partir del destete cada 15 días con la misma cantidad de parásitos hasta 180 días. A lo largo del estudio se analizaron parasitemia (P) y anticuerpos séricos (AS) en muestras de sangre extraída de la cola. Se registró electrocardiograma (ECG) mensual, y se realizó autopsia al finalizar el estudio, evaluándose la presencia de daño miocárdico por histopatología. No hubo diferencias en la P inicial y en los AS entre GI y GR. En GR además no se detectaron parásitos luego de las reinfecciones. No se hallaron cambios distintivos en los ECG de GI y GR con respecto a GC. Histopatológicamente no se detectaron cambios relevantes a nivel auricular, en tanto que a nivel ventricular se halló miocarditis moderada en GI (5/5) y en GR (5/5) vs 1/5 miocarditis leve en GC ($p < 0.05$). Se concluye que la reinfección con Tc en este modelo animal no modificó el cuadro evolutivo (P, AS y ECG), ni el tipo ni el grado de lesión cardíaca.

406. Propiedades Inmunológicas y Antimicrobianas de decocciones de Minthostachys verticillata. Ana M. Maldonado(1), Laura N. Cariddi(1), Mirtha Demo(1), Daniela Calvo(1).

(1)*Departamento de Microbiología e Inmunología. Universidad Nacional de Río Cuarto* mailto:amaldonado@exa.unrc.edu.ar

Se investigaron las propiedades antimicrobianas, inmunogénicas y linfoproliferativas de decocciones derivadas de *Minthostachys verticillata* (M.v.). Se investigó la inmunogenicidad del derivado vegetal por inmunización de conejos. Los anticuerpos específicos se evaluaron por pruebas de precipitación y HAP. Se estudiaron muestras de 25 pacientes 13 con lesiones de acné y 12 controles. Se tipificaron las cepas y se sembraron en estrías radiales en agar tripticasa soya adicionado de la decocción. Se determinó la capacidad de expansión leucocitaria en cultivos adicionados con Bacto-Phytohemagglutinin M (PHA-M), o decocción vegetal o sin agregado de antígeno. Se caracterizaron por IFD los LT CD8(+). Los anticuerpos específicos fueron hemaglutinantes

no precipitantes. Las decocciones inhibieron el 100% de las cepas de *Staphylococcus aureus* (S.a.). M.v. tuvo efectos mitogénicos similares a PHA-M, ($p = ns$, t de Student). El 42% de las células proliferadas fueron LT CD8(+). Las decocciones de M.v. fueron inmunogénicas y los anticuerpos tuvieron características de co-precipitantes. M.v. tuvo actividad antibacteriana sobre S.a., sobre los leucocitos efectos de mitógeno e inmunomodulador sobre los LT CD8(+).

407. Validación del algoritmo para diagnosticar Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH) en el área central de Argentina. Ana M. Briggiler(1), María R. Feuillade(1), Eleonora Crivelli(1), Delia A. Enria(1).

(1)*Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas «Dr. Julio I. Maiztegui»*

El algoritmo originalmente propuesto para el Síndrome Pulmonar por Hantavirus sugiere que ante un paciente con fiebre, mialgias y riesgo epidemiológico, serían indicadores de la enfermedad una saturación de oxígeno $< 90\%$ ó plaquetopenia ≤ 130.000 plaquetas/mm³, con leucocitosis con o sin desviación a la izquierda e incremento del hematocrito (Hto) ó trama intersticial o bilateral en la radiografía de tórax. Nuestro objetivo fue evaluar este algoritmo en su sensibilidad (S) y especificidad (E) para la región central de Argentina. Se estudiaron 73 casos con sospecha clínica de SPH; 32 se confirmaron como infección por hantavirus y los 41 restantes se utilizaron como controles. Entre éstos, en 21 el diagnóstico final fue Fiebre Hemorrágica Argentina y en los otros 20 no se arribó a diagnóstico etiológico (Síndromes febriles inespecíficos). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: fiebre S= 100% y E= 0%, mialgias S= 81% y E= 34%, plaquetopenia S=100% y E= 12%, leucocitosis >9000 S= 23% y E= 98%, Hto $>47\%$ S= 58% y E= 98%, infiltrado pulmonar S= 75% y E= 83%. El cumplimiento total o parcial del algoritmo propuesto mostró S= 63% y una E= 88%. Cuando se consideraron leucocitos > 4000 /mm³ mejoró la S= 72% y conservó una adecuada E= 85%. Esta validación del algoritmo sería aplicable para la región en estudio, pero se considera necesario repetirla en las diferentes regiones acorde a los diagnósticos diferenciales más frecuentes.

408. Perfil de citoquinas y caracterización de infiltrados uterinos en la enfermedad de Chagas experimental. María E. Solana(1), Stella M. González Cappa(1).

(1)*Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Fac. Medicina. UBA* mailto:smgacappa@fmed.uba.ar

Estudios previos en ratones mostraron disminución en la fertilidad de hembras infectadas con *Trypanosoma cruzi* K-98 (miotrópica) y mayor número de resorciones fetales atribuibles a la respuesta inflamatoria uterina. (No ocurrió esto con la cepa reticulotrópica RA a pesar que produjo infección fetal). Aquí estudiamos la composición de los infiltrados inflamatorios y el perfil de citoquinas en la fracción citoplasmática soluble uterina (citosol) y en suero de ratones hembra C3H de 2-3 meses infectados con 5×10^4 K98-tripomastigotes, via intradermoplantar. Al mes analizamos por inmunohistoquímica el fenotipo de los infiltrados y obtuvimos el citosol (105000 g). Las células mayoritarias fueron LT CD4 (mediana, $m = 57\%$, rango= 20-66%) con un porcentaje variable de LT CD8, LB (sigG+ o sigM+), macrófagos y NK. La medición de citoquinas por ELISA (pg/ml) mostró diferencias con los controles para IFNg en citosol ($m = 108,4$ vs 0^* ; $p < 0,005$, Mann-Whitney), IL-4 ($m = 22,91$ vs 0^* ; $p < 0,05$) e IL-2 ($m = 114,5$ vs $27,47$; $p < 0,05$). En suero sólo hubo diferencias en IFNg ($m = 110$ vs $59,75$, $p < 0,01$). No se registraron diferencias en IL-10 en suero ni en citosol con los controles. Estos resultados indicarían la existencia de un patrón mixto local Th1/Th2. El predominio local de IFNg e IL-2, y la falta de diferencias en IL-10 podrían interferir el curso gestacional induciendo resorciones fetales. (* Valores bajo el límite de detección). Financiado por FONCYT, UBA y CONICET.

INMUNOLOGÍA VIII

- 409. Expresión de CD1 en células presentadoras de antígeno (CPA) en pacientes con Tuberculosis Pulmonar Activa (TB).** Juan M. Illarregui(1), Silvia S. de la Barrera(1), Susana B. Fink(1), Ana García(2), María Saab(2), Eduardo Abbate(3), María C. Sasiain(1), Marta R. Finiasz(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina (2)Servicio de Tisioneumonología, Hospital Muñiz (3)Instituto Vaccarezza, Hospital Muñiz
mailto:juanila@yahoo.com

Inicialmente, se demostró que los linfocitos T CD4 y CD8 reconocían a los péptidos extraños a través de las moléculas de histocompatibilidad de Clase I y Clase II expresadas en las CPA. Recientemente se ha demostrado que ciertas poblaciones de CPA pueden presentar lípidos y glucolípidos bacterianos en una forma no tradicional mediante el empleo de moléculas pertenecientes a la familia CD1. El objetivo de este estudio fue determinar por citometría de flujo, la expresión de las moléculas CD83, CD1a, CD1b y CD1c en las CPA de pacientes con TB en los estadios clínicos moderado (M; n=5) y grave (G; n=5). Se obtuvieron células mononucleares por gradiente de Ficoll-Hypaque y se incubaron durante 6 días con IL-4 y GM-CSF (CKs), para generar CD83+, sin y con el agregado de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtub) durante las últimas 18 horas de cultivo. Resultados: Control + CKs: (%) CD83: 25.9±4.3(M), 9.35±3.9(G); CD1a: 12.9±3.9(M), 4.9±1.8(G); CD1b: 20.4±4.7(M), 12.1±2.5(G); CD1c: 24.4±9.1(M), 6.3±0.8(G). Mtub + CKs: (%) CD83: 23.9±2.7(M), 15.6±3.3(G); CD1a: 14.1±5.7(M), 6.2±1.5(G); CD1b: 15.7±5.9(M), 9.0±1.9(G); CD1c: 25.1±7.7(M), 9.8±3.6(G). Los resultados demuestran que los pacientes con TB grave presentan un menor % de CPA CD1+ y una menor capacidad de generar células CD83+, no siendo modificados por el agregado de Mtub. Las diferencias encontradas entre pacientes con TB moderada y grave podrían vincularse con el proceso inflamatorio asociado al estadio clínico de la enfermedad.

- 410. La IL-9 revierte la inhibición por IL-10 e IL-13 de la citotoxicidad (Cx) anti-*Mycobacterium leprae* (M.leprae).** Clara Franco(1), Marta R. Finiasz(1), Silvia S. de la Barrera(1), María H. Fariña(2), Graciela Pizzariello(2), Jacques Van Snick(3), Jean Renauld(3), María C. Sasiain(1), Susana B. Fink(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. (2)Dermatología, Hospital Muñiz. (3)Université de Louvain, Bruselas, Bélgica.
mailto:mcfranco@hematologia.anm.edu.ar

La IL-9 es una citoquina (CK) tipo 2 cuyo papel en infecciones no ha sido muy estudiado. Anteriormente demostramos que podía revertir el efecto inhibitorio de la IL-4 sobre la Cx anti-*M.leprae*. Ahora estudiamos qué ocurría con otras CKs inhibitorias de esa función como la IL-10 y la IL-13. Se purificaron células mononucleares periféricas de controles normales (N) y pacientes con lepra (P). Se cultivaron 7 días en presencia o no de *M.leprae* y/o CKs y se enfrentaron con macrófagos autólogos estimulados al día 6 con *M.leprae*. Resultados Cx % (media+ ES): IL-10 N (n=5): 26.40±3.25; IL-9: 41.40±6.57; IL-10: 12.8±0.73; IL-9+IL-10: 44.80±6.83 IL-10 P (n=5): 22.20±4.30; IL-9: 19.4±2.90; IL-10: 3.0±1.80; IL-9+IL-10: 15.8±3.4. IL-13 N (n=6): 24.5±1.5; IL-9: 21.83±1.92; IL-13: 8.17±2.33; IL-9+IL-13: 17±2.01. IL-13 P (n=5): 17.8±1.39; IL-9: 17.8±2.48; IL-13: 6.00±1.64; IL-9+IL-13: 15.40±4.01. El efecto es específico en ambos casos ya que se inhibe con un anticuerpo anti-receptor de IL-9. Se observa tanto en N como en P. Aparentemente el interferón gamma estaría involucrado. La IL-9 puede entonces revertir la inhibición de la función citotóxica por IL-10 e IL-13 (como por IL-4), tanto en N como en todos los P. Se destaca esto siendo todas CKs tipo 2 cuya actividad biológica es en general en el mismo sentido.

- 411. Expresión de co-receptores para el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) luego del cultivo de leucocitos mononucleares (LM) de pacientes VIH+.** Liliana E. Belmonte(1), María M. Bracco(1), Beatriz Ruibal Ares(1).

(1)Instituto de Investigaciones Hematológicas- Academia Nacional de Medicina
mailto:lilibelmonte@yahoo.com.ar

Se estudiaron variaciones en la expresión de los co-receptores CXCR4 y CCR5 luego del cultivo no estimulado de LM de pacientes VIH+ (LM VIH+). Se analizó por citometría de flujo su presencia en linfocitos T desde el inicio hasta 20 días de cultivo. Los resultados indican que CCR5 descendió ($p < 0.05$) tanto en linfocitos CD4+ como en CD8+ luego de 7 días de cultivo de LM VIH+ (Media+SEM, CCR5/CD4 %: pre-cultivo 15.6±6; 7 días 6.7±2; CCR5/CD8: pre-cultivo 31±7; 7 días 8±8, n=6) en comparación con LM VIH- (CCR5/CD4 %: pre-cultivo 13.6±1; 7 días 11.5±4.2; CCR5/CD8 %: pre-cultivo 24.5±3; 7 días 28.5±5, n=6). Los valores de CXCR4 aumentaron en linfocitos CD4+ y CD8+ luego de 2 días (50-80 % a 98-100%) y se mantuvieron estables a lo largo del cultivo tanto en LM VIH+ como en LM VIH-. Para comprobar si la disminución de expresión de CCR5 estaba asociada a la replicación viral, se infectaron LM VIH- (pre-cultivados por 6 días) con sobrenadantes de cultivos de LM VIH+. Luego de 3 días de infección (p.i.) la expresión de CCR5 se redujo en LM CD4+ (pre-infección: 13±2%; 3 días p.i. 2.4±1.2; $p < 0.01$, n=4), recuperándose parcialmente entre los 7-20 días p.i. (6.5±2). En cambio la expresión de CXCR4 no varió significativamente. Los resultados fueron similares en los linfocitos CD8+ y coincidieron con la replicación viral durante el cultivo. Tanto la interacción de VIH con el complejo CD4-CCR5, como la liberación de quimiocinas beta post infección podrían participar en la modulación de CCR5.

Ganador del Premio «Dr. Patricio M. Cossio»

- 412. Modulación de la respuesta inmune innata hacia la infección vaginal con Herpes simplex tipo 2 por inhibición de la óxido nítrico sintetasa.** Fabián Benencia(1), Gisela Gamba(1), Hernán Cavalieri(1), María C. Courreges(1), Ernesto J. Massouh(1).

(1)Laboratorio de Inmunoquímica, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA.

Se investigó la respuesta inmune innata en grupos de 10 ratones Balb/c infectados intravaginalmente con 10 exp 6 UFP de herpes simplex virus tipo 2 (HSV-2), cepa G, y a distintos días post-infección (p.i.) se tomaron muestras de vagina y ganglios linfáticos inguinales (GLI) para determinar la cinética de activación de la iNOS mediante un DOT-BLOT. Se observó una activación de la iNOS a nivel GLI a las 24 hs p.i. y al día 3 p.i. se obtuvieron muestras positivas en vagina. Por histología se reveló la presencia de exudado inflamatorio en vagina compuesto primariamente por PMN. Grupos de 10 ratones se trataron vía intraperitoneal (0.5ml) por tres días, a partir del día de la infección, con diferentes concentraciones (0.4, 2 y 10 mg/ml) de aminoguanidina (AG, un inhibidor específico de la iNOS) en PBS. En los ratones tratados se observó una patología más severa (día 3 p.i., controles: 50% de enfermedad, tratados 0.4mg/ml, 75% de enfermedad, $p < 0.05$; 2 mg/ml y 10 mg/ml, 100% de enfermedad, $p < 0.05$) y un aumento en los niveles de PMN en vagina y en lavados vaginales, así como un aumento en los títulos virales en secreciones vaginales y en vagina. Por RT-PCR se observó un aumento en las muestras positivas para RANTES y MIP-2 en los ratones tratados. Se propone que el aumento de los títulos virales generados por el bloqueo de la iNOS induciría un aumento en la expresión de quimiocinas, determinando un aumento en el influjo de PMN con el consecuente agravamiento de la patología vaginal.

- 413. Análisis del valor inmunoprotectivo de los antígenos recombinantes de *Toxoplasma gondii* Rop2 y Gr4 combinados con aluminio en un modelo murino de infección**

toxoplásmica. Valentina Martín(1), Mónica Nigro(1), Sergio O. Angel(1).

(1)Administración Nac. de Laboratorios e Institutos de Salud «Dr. C. G. Malbrán», Dpto. Parasitología

Los antígenos de las roprias Rop2 y de los gránulos densos Gra4, del parásito *Toxoplasma gondii*, se expresaron en *Escherichia coli* como proteínas de fusión conteniendo seis residuos de histidina en sus extremos N-terminales (rRop2 y rGra4 respectivamente). Con estas proteínas adsorbidas en Al(OH)₃ se inmunizaron intramuscularmente ratones hembras C57BL/6. A los 14 días del último refuerzo, los ratones fueron desafiados con 20 quistes tisulares de la cepa Me49 de *Toxoplasma* administrados por vía oral. Un mes después los ratones fueron sacrificados y se contaron los quistes presentes en cerebro. Los ratones inmunizados con rRop2 mostraron un número de quistes en cerebro (1506 ± 434) similar al grupo control PBS-Al(OH)₃ (1170 ± 3550). Por el contrario, los ratones inmunizados con rGra4 mostraron una disminución en la formación de quistes en cerebro (706 ± 125 versus 1583 ± 673 para PBS-Al(OH)₃). Los ratones inmunizados con rRop2 y con rGra4 mostraron una respuesta humoral con predominio del isotipo IgG1 antes del desafío, invirtiéndose hacia un predominio de IgG2a un mes después del desafío. Los ratones inmunizados con PBS-Al(OH)₃ mostraron sólo la presencia de anticuerpos del subtipo IgG2a contra estas proteínas, y recién en la muestra post-desafío. rGra4 adsorbida a aluminio parecería ser un buen sistema candidato para ser usado en el diseño de una vacuna multiantigénica contra *T. gondii*, mientras que rRop2 con aluminio tendría poco valor para este mismo uso.

414. Estudio de la modulación de los patrones de citoquinas por moléculas coestimuladoras y proteínas de señalización en la tuberculosis humana. Virginia Pasquinelli(1), María F. Quiroga(2), Liliana Castro Zorrilla(3), Eduardo Abbate(3), Verónica E. García(1).

(1)Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA (2)Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, UBA (3)Departamento de Inmunología, Instituto Vaccarezza, Facultad de Medicina, UBA virpasquinelli@uol.com.ar

La tuberculosis (TBC) es la principal causa de muerte mundial causada por una enfermedad infecciosa. Las citoquinas son cruciales en la inmunidad contra *M. tuberculosis*, y las células Th1 productoras de IFN- γ son responsables del establecimiento de una respuesta inmune celular específica. La molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM) y la proteína de señalización SAP (proteína de unión a SLAM) participan en la modulación del establecimiento de respuestas de citoquinas Th1/Th2. Se investigó el rol de SLAM y SAP en la infección por *M. tuberculosis*. La expresión de SLAM en linfocitos de pacientes con TBC fue mayor que en dadores normales. Más aún, la estimulación con *M. tuberculosis* indujo aumento de SLAM en células T de pacientes con TBC. Además, la respuesta in vitro al antígeno, mostró alta proliferación celular y producción de IFN- γ en un grupo de pacientes, y baja proliferación y producción de IFN- γ en otro grupo. La estimulación a través de SLAM indujo un marcado aumento de IFN- γ en pacientes con fuerte respuesta al antígeno y un moderado incremento de IFN- γ en pacientes con débil respuesta a *M. tuberculosis*. Asimismo, detectamos alta expresión de SAP en células T de pacientes con fuerte respuesta a *M. tuberculosis* luego de estimulación antigénica, mientras que la proteína no fue detectada en pacientes con débil respuesta a la bacteria. Estos resultados señalarían un rol para SLAM y SAP en la modulación de los patrones de citoquinas producidos por células T en TBC.

415. Efecto de *Lactobacillus plantarum* sobre una infección por *Pseudomona aeruginosa* en un modelo de injuria térmica. Juan C. Valdez(1), María C. Peral de Portillo(2), Mirta M. Rachid(3), Gabriela Perdígón(4).

(1)Cátedra de Inmunología, Facultad de Bioq., Qca. y Farmacia. U.N.T. (2)Dep. Biomédico, Fac. de Medicina. U.N.T. (3)Inmunología, Fac. de Bioq., Qca y Farmacia U.N.T (4)Cátedra de Inmunología, Fac. de Bioq.,Qca. y Farmacia. U.N.T- CERELA catinmu@mail.unt.edu.ar

La *P. aeruginosa* afecta a individuos inmunocomprometidos incluyendo a los quemados. La infección involucra interferencias en las señalizaciones de las cel. fagocíticas. Se demostró que los lactobacilos incrementan la capacidad fagocítica. Objetivos.: Determinar si *L. plantarum* modifica la actividad fagocítica en infección por *Pseudomona* Métodos: Ratones Balbc/C quemados grupo (Q) se infectaron con *P. aeruginosa* (2x10⁶UFC) grupo (Q +Ps), parte de ellos se inocularon 3 d. después, intralesionalmente con 10⁸ *L. plantarum* cada 2 d. durante 12 d.(Q+Ps+Lb). A los 5 y 15 d. se realizó: 1) Rec. leuc, 2)retrocultivos de la lesión, sangre, bazo e hígado. 3) Fagocitosis de *L. plantarum* y *P. aeruginosa* por IFI en cél. de la lesión. Result.:1) A los 5 d. se observó leucocitosis con neutrofilia en los grupos estudiados (C=5000, Q=6500). 2) A los 15 d. Q+Ps disminuyó la leucocitosis y neutrofilia, no así en Q+Ps+Lb donde se incrementó (7500) con disminución de neutrofilia. 3)Las UFC en la lesión se incrementó en Q+Ps a los 5 y 15 d. (5d=1,3x10⁷, 15 d= 1,6x 10⁸) no así en el grupo Q+Ps+Lb (5d= 6x10⁵, 15d=4x10³). No se detectaron bacterias en sangre, bazo e hígado.4) La fagocitosis en el grupo Q+Ps se incrementó a los 5d (70%), disminuyendo a los 15 d = 13%. En Q+Ps+Lb a los 5 d (47%) a los 15 d (37%). Conclusiones.: 1) *L. plantarum* revierte la disminución leucocitaria, 2)reduce la colonización, 3) estimula a más del doble la fagocitosis a los 15 días.

416. Activación alternativa e incremento de la replicación de *Trypanosoma cruzi* en macrófagos murinos estimulados con cruzipaina. Cinthia C. Stempin(1), Natalia L. Guiñazú(1), Laura Giordanengo(1), Susana E. Gea(1), Fabio M. Cerbán(1).

(1)Inmunología. Dpto. Bioquímica Clínica. Facultad Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba cstempin@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Cruzipaina (Cz) induce IL10 y urea (por activación de arginasa) en macrófagos (Mo) murinos. IL12 y óxido nítrico fueron inducidos por LPS. En este trabajo estudiamos la relevancia biológica de la interacción de Cz con Mo murinos en la infección con *T. cruzi*. Se usaron como antígenos: Cz, R13: péptido derivado de proteínas ribosomales P de *T. cruzi* y LPS. Como fuente de Mo: células J774 y Mo peritoneales de ratones normales. Estudios in vitro revelaron que células J774 estimuladas con Cz y luego infectadas con tripomastigotes (Tp) (4Tp/Mo) desarrollan un número mayor de parásitos (18,8±1,0x10⁵,p<0.05) respecto de las no estimuladas (8,8±3,1x10⁵). Las incubadas con LPS desarrollaron un número menor (1,0±0,7x10⁵,p<0.05) y las estimuladas con R13 no mostraron diferencias significativas. El estudio de iNOS por Western-blot reveló que Cz, a diferencia de LPS, no fue capaz de inducirlo. Cz indujo TGF- β en los sobrenadantes de células J774 (2980±241pg/ml,p<0.05 vs células sin estímulo) y de Mo peritoneales (1385±198 pg/ml,p<0.05 vs células controles). Cz no indujo GM-CSF. Cuando se preincubó Cz con IgG de ratón anti-Cz, antes de la infección de los Mo, éstos desarrollaron el doble de parásitos y produjeron el triple de TGF- β respecto de los Mo incubados con Cz e IgG control. En este contexto, los anticuerpos anti-Cz podrían facilitar la infección. Estos resultados sugieren que Cz favorecería la replicación del *T. cruzi* por inducción de una vía de activación alternativa en Mo murinos.

417. Caracterización de antígenos liberados por *Brucella canis* al medio de cultivo. Pablo C. Baldi(1), Victoria Delpino(1), Carlos A. Fossati(1).

(1)Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA mailto:pablobal@ffybu.uba.ar

Brucella es un patógeno intracelular facultativo que puede evadir el sistema endocítico-lisosomal de los fagocitos. *Brucella* posee los genes de un sistema de secreción tipo IV (VirB) cuyas mutaciones anulan la capacidad de la bacteria de evadir al lisosoma. Hasta el momento no se han podido detectar los efectores secretados por el sistema VirB. Nuestro objetivo fue tratar de identificar proteínas secretadas por *Brucella canis* al medio de cultivo en condiciones fisiológicas y de estrés ácido (pH 5.5) y oxidativo (H₂O₂ 150 mM). Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo en fase logarítmica, se los concentró 100 veces y se los analizó por SDS-PAGE y Western blot. La bacteria alcanzó la misma tasa de duplicación en todos los medios. En todas las condiciones ensayadas se observaron por PAGE bandas de 11, 14.5, 16, 22, 29, 32, 36 y 56.5 kDa. Todas las bandas fueron reveladas en un Western blot frente a un pool de sueros de pacientes brucelosos. Para determinar si estas proteínas formaban parte de vesículas de membrana externa o blebs (ya descritos en *B. melitensis*) se centrifugó a 125 000 x g durante 4 hs. El procedimiento eliminó todas las proteínas salvo la de 36 kDa. Los resultados sugieren que *B. canis*, al igual que otras brucelas, libera al medio de cultivo blebs conteniendo varias proteínas inmunogénicas. Además, secreta activamente una proteína de 36 kDa, la cual podría ser la primera proteína de secreción descrita en este género.

418. Utilización de un anticuerpo monoclonal anti-Paracoccidioides brasiliensis para la detección de anticuerpos específicos en pacientes con paracoccidioidomicosis. María Serradell(1), María L. Cacace(2), Néstor Taranto(2), Ricardo Negroni(3), Carlos A. Fossati(1).

(1)Cátedra de Inmunología-Ciencias Exactas-UNLP (2)Cátedra de Microbiología-UNSA(sede Orán) (3)Centro de Micología-Facultad de Medicina-UBA
mailto:maserr@biol.unlp.edu.ar

La paracoccidioidomicosis (PCM) es una micosis endémica en una amplia zona de Sudamérica, producida por el hongo *Paracoccidioides brasiliensis* (PB). El diagnóstico definitivo se realiza a través de la observación microscópica y el cultivo del agente etiológico, sin embargo es posible realizar un diagnóstico serológico de detección de anticuerpos o antigenemia. Nuestro objetivo fue analizar la posible utilidad diagnóstica de un ensayo de ELISA de captura con el anticuerpo monoclonal (AcM) 2C3 anti-PB que reconoce un componente de 63 kDa, y se lo comparó con un ELISA indirecto frente a un extracto citoplasmático del mismo hongo. En ambos ensayos se analizó la presencia de anticuerpos (Ac) específicos en sueros de pacientes con PCM y de pacientes con histoplasmosis (HP). Los valores de corte de los ensayos se determinaron con suero de individuos sanos. Se analizaron 47 pacientes con PCM y 10 con HP confirmadas. El ensayo de captura resultó positivo en 33 de los pacientes con PCM y en 3 de los casos de HP. Notablemente, el ELISA indirecto solo resultó negativo en 2 pacientes con PCM, mientras que en los 55 sueros restantes resultó positivo. Los resultados obtenidos sugieren que para PCM el ELISA indirecto mostraría una mayor sensibilidad, mientras que el ensayo de captura parece ser más específico, lo cual es importante para el diagnóstico diferencial entre PCM y HP.

419. Efecto estimulante de la dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la respuesta proliferativa in vitro a sonicado de M.tuberculosis (ST) en pacientes con tuberculosis pulmonar (TB) leve. Carolina Mahuad(1), Diana Dlugovitzky(2), María L. Bay(1), Oscar Bottasso(1).

(1)Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario (2)Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario
Bottasso@arnet.com.ar

Previamente demostramos que el tratamiento in vitro con Cortisol (CORT) y DHEA suprime o estimula, respectivamente,

la respuesta proliferativa de células periféricas mononucleares (CPM) estimuladas con ST en sujetos sanos respondedores al mismo. Para saber si tales efectos se observan en pacientes con TB, se cultivaron CPM de 7 controles (Co) y 11 enfermos (4 leves -Le- y 7 moderados -Mo-) (47±15 años, media general ± ds) durante 5 días estimuladas con ST en presencia, o no, de CORT (10 -6, 10 -7 M) o DHEA (10 -7, 10 -8, 10 -9 M). Los resultados expresados como, cpm cultivo con ST+hormona/cpm cultivo con ST x 100 (media ± es) fueron: 10 -6 M CORT= Co 37±6, Le 36±12, Mo 37±4; 10 -7 M CORT= Co 67±6, Le 65±14, Mo 61±8; 10 -7 M DHEA= Co 98±9, Le 166±26, Mo 101±11 (Le vs. Co, p<0.01); 10 -9 M DHEA= Co 106±6, Le 144±8, Mo 98±10 (Le vs. Co, p<0.005). Los estudios combinando CORT y DHEA (un conocido antagonista) en diferentes concentraciones mostraron que la inhibición provocada por CORT, tanto en Co como en TB, no se revirtió con ninguna dosis de DHEA, si bien los Co tendieron a mostrar una recuperación parcial de la blastogénesis en presencia de ésta. La respuesta inespecífica ante Concanavalina A apareció significativamente deprimida en todos los pacientes (p<0.001). El efecto estimulante aislado de la DHEA sobre la linfoproliferación en TB leve podría tener relevancia en los mecanismos de inmunoregulación extrínsecos teniendo en cuenta la acción facilitadora Th1 de esta hormona.

420. Infección in vitro con Trypanosoma cruzi en macrófagos peritoneales (MP) de ratones sometidos a un protocolo de desensibilización al LPS. Ana Pérez(1), Maximiliano Tamae Kakazu(1), Eduardo Roggero(1), Jeanne Wietzerbin(2), Oscar Bottasso(1).

(1)Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario (2)Unite 365, Institut Curie, París, Francia
Bottasso@arnet.com.ar

Dado que el pretratamiento con LPS modifica la funcionalidad de los macrófagos y los hallazgos previos de que los MP de animales pretratados con dicha endotoxina son más permisivos a la multiplicación del Tc, nos propusimos analizar una serie de mediadores sintetizados por dichas células de relevancia en esta tripanosomiasis. Se obtuvieron MP de ratones C57BL/6 adultos, controles (Co, n=5) o pretratados (una inyección i.p. de LPS 2µg/vez, 4 días consecutivos, más una dosis de 200µg al día 5, en simultáneo con inyecciones de pentoxifilina (puede atenuar el estado de tolerancia) 2mg/ratón/vez en los mismos intervalos (LpsPtx, n=5). Los MP se recogieron 3 días después y se cultivaron en placas, 3 x 10⁵ células/pozo (MEM suplementado). Luego de 2 hs, los MP fueron expuestos a Tc de la cepa Tulahuén relación parásito-célula 1:1 durante 48 h. Los resultados de las mediciones de factor de necrosis tumoral alfa (FNT), interleucocinas 10, IL-1 beta y nitritos en sobrenadantes de 48 hs de cultivo fueron (media ± es): FNT Co 1038±163 (pg/ml) LpsPtx 112±31.7 (p<0.01), IL-10 Co 147±39, LpsPtx 835±302 (p<0.025), IL-1 Co 66±28.6, LpsPtx 22.6±9.5 (p<0.025), nitritos (µM) Co 56.3±27, LpsPtx 36.4±14.8. La comparación en sobrenadantes de 24 hs de cultivo arrojó un patrón similar de resultados. El pretratamiento con LpsPtx altera la síntesis de citocinas del macrófago favoreciendo la producción de mediadores inactivadores que podría explicar el mayor número de amastigotes observado previamente.

421. Análisis discriminante de la respuesta linfoproliferativa de células periféricas mononucleares (CPM) de pacientes con artritis reumatoidea (AR) ante la estimulación con antígenos micobacterianos. Flavia Rondelli(1), Daniel Wojdyla(1), Mario Goñi(1), Bernardo Pons-Estel(1), Alberto Gentiletti(1), Carolina Mahuad(1), Oscar Bottasso(1), María L. Bay(1).

(1)Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario
Bottasso@arnet.com.ar

Previamente demostramos que los pacientes con AR tienen una baja respuesta proliferativa al estimular sus CPM con extrac-

los solubles de 13 especies de micobacterias medioambientales. Para analizar si esta alteración se relaciona con parámetros clínicos de la AR, se efectuó un análisis discriminante que permite derivar una nueva variable como combinación lineal de variables cuantitativas (índices de estimulación -IE- para c/antígeno); donde las blastogénesis deprimidas se reflejan en valores negativos. Se estudiaron 29 pacientes con diagnóstico de AR sin inmunosupresores y 28 controles (Co), similares en sexo, edad (46 ± 12 años, ds) y cicatriz de BCG. Las CPM se cultivaron 5 días y los IE se utilizaron para generar 2 nuevas variables, correspondientes a estímulos con antígenos de micobacterias de crecimiento rápido (R) o lento (L). La reducida blastogénesis de los AR hizo que las 2 funciones presentaran valores cuantitativamente inferiores a los Co (R, $p=0.04$ y L $p=0.003$). Al comparar distintos parámetros clínicos (erosiones, número de articulaciones y tiempo de evolución), los casos con enfermedad relativamente reciente presentaron resultados más negativos en la variable R respecto de los pacientes con mayor antigüedad (<24 meses -0.649 , >24 meses -0.174 , $p=0.05$). El hecho de que los pacientes más recientes tienden a presentar mayor actividad de la AR, haría suponer que el defecto descripto se relaciona con trastornos inmunoregulatorios vinculados a esta última variable.

422. Supresión de respuesta artrítica en ratas crónicamente infectadas con Trypanosoma cruzi (Tc) y su relación con una baja producción in vitro de citocinas con acción inflamatoria. Griselda Dídoli(1), Flavia Rondelli(1), María L. Bay(1), Oscar Bottasso(1).

(1)Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario
Bottasso@arnet.com.ar

Trabajos previos en ratas 'I' infectadas crónicamente con Tc muestran una respuesta artrítica (AA) deprimida ante el desafío con Adyuvante Completo de Freund (pata trasera derecha), que se revierte dando ciclofosfamida (Cy) 48 hs antes de la inducción. Dado los efectos inflamatorios del factor de necrosis tumoral alfa (FNT) y la IL-12 se evalúan sus niveles en los sobrenadantes de cultivo (36 hs) de células del ganglio poplíteo drenante, estimuladas con Concanavalina (ConA) o sonicado total de M. tuberculosis (ST); de ratas con 90 días de infección con Tc y controles similares (Co), tratadas con Cy (25 mg/kg) o fisiológica (48 hs antes de inducir la AA). Las mediciones por ELISA (media \pm es, pg/ml, $n=4-5$ /grupo) al día 0 (inducción de AA) mostraron niveles muy bajos de IL-12 en todos los cultivos con valores bien evidentes de FNT sin diferencias entre grupos (estimulados con ConA o ST). Pico de la AA (15 días después), FNT, ST= Co 207.5 ± 68 , Co+Cy 166.8 ± 30 , Tc 115 ± 16 , Tc+Cy 370.9 ± 145 (Tc vs Tc+Cy, $p=0.02$); ConA= Co 835 ± 111.2 , Co+Cy 738.3 ± 145 , Tc 700 ± 124 , Tc+Cy 1158 ± 148 (Tc vs Tc+Cy $p<0.05$). IL-12, ST= Co 7.8 ± 2 , Co+Cy 7.3 ± 0.7 , Tc 10 ± 2.4 , Tc+Cy 13 ± 2.7 ; ConA= Co 18.3 ± 3.4 , Co+Cy 19.8 ± 3.6 , Tc 19.9 ± 3.4 , Tc+Cy 35 ± 4.2 ($p<0.05$). Se midieron los niveles de nitritos sin diferencias entre grupos. El restablecimiento ya conocido de la AA en el grupo Tc+Cy se asocia a una recuperación en los valores de FNT y en menor grado a un incremento en los niveles de IL-12, en las ratas artríticas.

423. Inducción de Apoptosis por Glucuronoxilomanano de Cryptococcus neoformans en Esplenocitos de Ratas Normales. Laura Chiapello(1), Pilar Aoki(1), Susana Castillo(1), Héctor Rubinstein(1), Diana T. Masih(1).

(1)Fac. Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba
mailto:chiapello@bioclin.fcq.unc.edu.ar

El objetivo de este trabajo fue determinar si el principal polisacárido capsular de Cryptococcus neoformans, glucuronoxilomanano (GXM), induce apoptosis en esplenocitos in vitro y estudiar si durante el período inmunosupresor de la infección experimental en ratas con el hongo se induce apoptosis en los órganos infectados. Para ello se determinó la fragmentación del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 2% y reacción de TUNEL en

esplenocitos de ratas normales cocultivados con GXM (50mg/ml) por 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Se observó que GXM indujo el clivaje del ADN en fragmentos de tamaño oligonucleosomal y reacción de TUNEL positiva en extendidos de las células de cultivo. El análisis por citometría de flujo de los esplenocitos marcados con yoduro de propidio demostró que en presencia de GXM se observa un aumento de aproximadamente 30% de ADN subdiploide. Por otra parte la reacción de TUNEL reveló niveles aumentados de apoptosis en secciones de pulmón y bazo de ratas infectadas con C. neoformans (período inmunosupresor). En pulmón se observó apoptosis de células con características de macrófagos histiocitarios, células fundamentales para la eliminación del hongo. Se puede concluir que GXM induce muerte celular programada en esplenocitos de ratas normales in vitro, y en animales infectados con C. neoformans se observa apoptosis durante el período inmunosupresor. La participación de GXM en la muerte celular durante la infección se está investigando actualmente.

424. IL-4 rescata de la apoptosis a linfocitos B de ratones infectados con Trypanosoma cruzi. Eva V. Acosta Rodríguez(1), Elina I. Zúñiga(1), Carolina L. Montes(1), Adriana Gruppi(1).

(1)Inmunología. Dpto de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Univ. Nacional de Córdoba
eacosta@bioclin.fcq.unc.edu.ar

La fase aguda de la infección con T. cruzi se caracteriza por una inmunosupresión generalizada que ha sido asociada a una masiva apoptosis de LiT o LiB. Dilucidar los mecanismos involucrados en el rescate de LiB aportaría datos para diseñar estrategias que favorezcan el desarrollo de una respuesta humoral protectora. Con el objetivo de identificar señales que rescaten de la muerte a los LiB de ratones infectados, evaluamos el efecto de IL-4. Para ello, LiB purificados de ratones normales (BN) o infectados (BI) fueron cultivados con o sin IL-4. Luego de 18hs de cultivo observamos mediante FACS que IL-4 (25ng/mL) inhibe la apoptosis de BN (65%) y de BI (55%) sin inducir proliferación (determinada por la ausencia de incorporación de H3-Timidina). IL-4 rescató de la muerte a LiB IgM (42%BN-62%BI) e IgG (72%BN-60%BI) aunque no modificó la concentración de isotipos de Igs en sobrenadantes de 96 hs de cultivo de BN o BI. IL-4 no modificó la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 ó Bcl-xL ni la expresión de Fas de superficie en BN o BI. Sin embargo, disminuyó un 50% la expresión de FasL en BI indicando que, dado que los BI cometen fratricidio via Fas/FasL, la disminución en la expresión de FasL podría ser responsable del rescate de BI inducido por IL-4. Considerando que IL-4 incrementa la expresión de MHCII en BI y BN, y que el transactivador de clase II (CIITA) está involucrado en la disminución de FasL, es posible que este factor sea clave para el rescate mediado por IL-4.

425. Modificación de la inmunocompetencia del macrófago por efecto del estrés. Implicancias en la progresión de la infección por Candida albicans. María C. Rodríguez-Galán(1), Claudia E. Sotomayor(2), María E. Costamagna(3), Ana M. Cabanillas(3), Beatriz M. Salido Rentería(2), Ana M. Masini-Repiso(3), Silvia G. Correa(2).

(1)Inmunología, Departamento Bioquímica Clínica. Fac. Ciencias Químicas Univ. Nac. Cba (2)Inmunología, Depto Bioquímica Clínica. Fac. Ciencias Químicas Univ. Nac. Cba (3)Química Clínica Depto Bioquímica Clínica. Fac. Ciencias Químicas Univ. Nac. Cba

La actividad fungicida de los fagocitos es uno de los principales mecanismos efectores en la infección por C. albicans, aunque la función de los macrófagos (Mf) es aún discutida. Nuestro objetivo fue evaluar la inmunocompetencia del Mf luego de la exposición a 3 días de estrés y su implicancia en la progresión de la infección. Ratas Wistar se infectaron ip (3×10^8 lev, grupo Ca) o se infectaron y estresaron durante 3 días (grupo CaE). Animales normales y sólo estresados se usaron como controles. En

el sitio de la infección el número de UFC fue mayor en el grupo CaE ($p < 0.03$) asociado a una menor actividad fungicida de los Mf ($p < 0.03$). En estas células, la infección activó el metabolismo de la arginina, pero la exposición al estrés moduló negativamente la producción de NO ($p < 0.05$), de urea ($p < 0.05$) y la expresión de la iNOS luego de la reestimulación in vitro con el hongo. Tanto la producción de TNF- α como el balance IL-1ra/IL-1 luego de la reestimulación in vitro con el hongo resultaron disminuidos en el grupo CaE ($p < 0.05$). Estos resultados muestran el profundo efecto del estrés sobre la función del Mf y revelan la importancia de esta célula en el control local y temprano de la infección por *C. albicans*.

426. Marcada hepatotoxicidad durante la infección por *Candida albicans* luego de exposición al estrés. María C. Rodríguez-Galán(1), Silvia G. Correa(2), Roxana Cano(3), Beatriz M. Salido Rentería(4), Nora L. Yranzo(2), Claudia E. Sotomayor(5).

(1)Inmunología, Departamento Bioquímica Clínica. Fac.Ciencias Químicas Univ. Nac. Cba (2)Inmunología, Depto Bioquímica Clínica. Fac.Ciencias Químicas Univ. Nac. Cba (3)Química Clínica Depto Bioquímica Clínica. Fac.Ciencias Químicas Univ. Nac. Cba (4)Inmunología. Clínica Depto Bioquímica Clínica. Fac.Ciencias Químicas Univ. Nac. Cba (5)Inmunología.Clínica Depto Bioquímica Clínica. Fac.Ciencias Químicas Univ. Nac. Cba
mailto:csotomay@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Ratas Wistar infectadas con *C.albicans* (3x 10⁸ lev.grupo Ca) y expuestas a un esquema de estrés(E) de 3 días(grupo CaE) presentan un marcado deterioro de la respuesta inmune local y una mayor susceptibilidad a la infección. Nuestro objetivo fue evaluar las modificaciones de parámetros sistémicos claves en este modelo, profundizando el estudio a nivel hepático, puesto que el hígado constituye una de las primeras barreras protectoras contra microorganismos intestinales y desempeña un rol importante en la prevención de la patología sistémica. En los animales CaE, se detectó un aumento sérico de la corticosterona ($p < 0.05$), hiperplasia de las células adrenales ($p < 0.001$) y disminución del peso del timo ($p < 0.02$) respecto a ratas normales. La mayor colonización hepática estuvo asociada a una respuesta inflamatoria pobre en el grupo CaE. Estudios histopatológicos revelaron hiperplasia de las células de Kupffer (ED2+, IA+) luego de la infección; aparición de esteatosis microvesicular difusa en el grupo Ca, y esteatosis mixta (macro-micro) localizada en la zona acinar 1 en el grupo CaE. Mientras que la infección provocó una marcada peroxidación lipídica (aumento en el nivel de malondialdehído), la aplicación del E exacerbó este fenómeno ($p < 0.05$). La actividad sérica de ALT y g-GT ($p < 0.05$) estuvo aumentada en el grupo CaE. En este modelo el hígado se comporta como órgano blanco, reflejando la mayor susceptibilidad a la infección por *C.albicans* luego de la exposición al estrés.

427. Efecto del péptido sintético, análogo al extremo C-terminal de la glicoproteína gp90 del virus de la anemia infecciosa equina, sobre el balance de citoquinas tipo1/tipo2. Adriana Soutullo(1), María I. García(2), Andrea L. Racca(2), Georgina Tonarelli(3), Javier Lottesberger(3), Ileana Malan Borel(2).

(1)Cátedra de Inmunología Básica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL-MAGIC (2)Cátedra de Inmunología Básica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL (3)Departamento de Química Orgánica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL

mailto:soutullo@fcb.unl.edu.ar

El virus de la anemia infecciosa equina es un lentivirus causante, en los animales, de infecciones persistentes con pérdida del rendimiento muscular. Uno de los componentes virales es una glicoproteína de superficie, gp90 involucrada en la entrada del virus a la célula. La evolución de la enfermedad dependerá del

equilibrio entre las replicaciones virales y los mecanismos inmunológicos. En este trabajo se analizó el efecto del péptido análogo a una región conservada de la gp90, sobre la inducción de citoquinas y síntesis de anticuerpos anti-gp90. Para ello grupos de ratones fueron inoculados con 0, 20 (bajas dosis) y 100mg (altas dosis) del péptido, cada 15 días, durante 120 días. Los animales fueron sangrados para analizar, por ELISA, los niveles de INFgamma, IL-4 y anticuerpos. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de INFgamma a partir del día 20 en los animales inoculados con bajas (18.3±14.3 pg/ml) o altas dosis (25.6±6.25 pg/ml) respecto del control (9.6±1.17 pg/ml). La máxima diferencia entre ambos grupos se observa a los 92 días, 44.2±38.35 pg/ml para 20ug y 27.7±16.38 pg/ml para 100ug. No habiendo diferencias en los niveles de IL-4 entre los grupos analizados ($P > 0.05$). La producción de anticuerpos fue observada en el grupo altas dosis (título1/16000) a partir del día 48. El péptido analizado sería capaz de desencadenar una respuesta inmune favorable a la eliminación del virus, estimulando la síntesis de citoquinas tipo1 y de anticuerpos.

428. Estudio de la funcionalidad de macrófagos en ratones knockout en TNFRp55 o IL-12p40 infectados con *Yersinia enterocolitica* O:8. María S. Di Genaro(1), Ana M.S. Guzman(1), Ingo B. Autenrieth(2).

(1)Area Microbiología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis (2)Instituto Max von Pettenkofer, Universidad Ludwig Maximilians, Munich, Alemania
mailto:sdigena@unsl.edu.ar

Yersinia enterocolitica es una bacteria enteropatógena altamente virulenta en ratones C57BL/6 knockout en TNFRp55 (TNFRp55^{-/-}) o IL-12 (IL-12p40^{-/-}). El objetivo del presente trabajo fue investigar la funcionalidad de macrófagos TNFRp55^{-/-} e IL-12p40^{-/-} frente a una la infección con *Yersinia*. Se estudió la actividad microbicida de macrófagos peritoneales de ratones TNFRp55^{-/-}, IL-12p40^{-/-} y C57BL/6 normales infectados in vitro con *Y. enterocolitica* O:8 (moi=100:1 y 10:1) luego de 90 minutos de incubación. En macrófagos peritoneales aislados 3 días postinfección con *Y. enterocolitica* (1 x 10³ CFU por vía i.p.), se analizó la expresión de RNAm de iNOS, JE, IL-12p40 e IL-10 por RT-PCR. Los valores fueron expresados como la relación de la intensidad de las bandas con respecto a beta-actina. Se observó que el porcentaje de muerte intracelular de *Yersinia* en macrófagos TNFRp55^{-/-} fue significativamente menor (11-27%) comparado con macrófagos normales (65-85%) ($p < 0.05$). Un aumento significativo en la expresión de RNAm de iNOS, JE e IL-10 fue detectado en macrófagos TNFRp55^{-/-}. No se observaron diferencias significativas en la funcionalidad de macrófagos IL-12^{-/-}. De los resultados puede concluirse que macrófagos deficientes en TNFRp55 presentan, a pesar de la up-regulación de iNOS, una alteración en su capacidad microbicida frente a *Yersinia*. Este defecto se debería a un aumento de la expresión de IL-10, citoquina desactivante de macrófagos.

NEFROLOGÍA II

429. Actividad citotóxica de toxina Shiga 2 sobre células epiteliales de corteza renal humana. Efecto de factores inflamatorios. Elsa Zotta(1), Gabriel Cao(1), Nesmo Levy yeyati(1), Crisitina Ibarra(1), Claudia Silberstein(1).

(1)Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires
mailto:ibarra@fmed.uba.ar

El objetivo de este trabajo fue estudiar en cultivos celulares de la corteza renal humana los efectos citotóxicos de toxina Shiga 2 (Stx2) y de factores inflamatorios que se encuentran aumentados en pacientes con Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Se desarrollaron cultivos primarios de células epiteliales de corteza renal a partir de pacientes adultos y pediátricos. Las células se incu-

baron con distintas dosis de Stx2 (0,7pg/ml-70ng/ml) durante 1-72 hs, en presencia o no de factores inflamatorios. Para evaluar la actividad citotóxica de Stx2 se observó la morfología celular por microscopía óptica, se midió la viabilidad celular y se evaluó la apoptosis por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. En todos los cultivos estudiados, Stx2 produjo una disminución significativa de la viabilidad y alteraciones morfológicas dependiendo de la dosis y el tiempo. Luego de 24 hs, Stx2 estimuló significativamente la apoptosis celular. Los efectos citotóxicos de Stx2 aumentaron significativamente al preincubar los cultivos celulares con lipopolisacárido (1mg/ml); interleuquina-1beta (0,1ng/ml); factor de necrosis tumoral alfa (1ng/ml) ó butirato 2mM. Mientras que las Interleuquinas 6 y 8 no modificaron la actividad citotóxica de Stx2. Los resultados indican que la insuficiencia renal producida en pacientes con SUH podría ser debida a un efecto directo de Stx2 sobre las células renales, potenciado por factores inflamatorios.

430. Edad de comienzo y pronóstico de la evolución en poliquistosis renal autosómica dominante (PRAD). Pablo J. Azurmendi(1), Adriana R. Fraga(1), Elvira E. Arrizurieta(1), Rodolfo S. Martín(1).

(1)Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari, U.B.A
mailto:pabloazur@hotmail.com

PRAD evoluciona a la insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) en tiempos variables. Tanto la incidencia de IRCT como los factores pronósticos en la velocidad de progresión (VdP) no han sido definitivamente establecidos. Se estudiaron pacientes (ptes) con al menos 3 creatininas plasmáticas (Crp) > de 2 mg/dl, n=40 (26 mujeres y 14 hombres), con un tiempo de seguimiento de 6.36 ± 0.85 (x±ES) años (0.85-21) y un total de 436 determinaciones de Crp. La VdP se evaluó por la pendiente de la inversa de la Crp (1/Crp) vs. edad del pte. Crp de 2 y 6 mg/dl fueron consideradas como comienzo de la progresión y necesidad de sustitución de la función renal (IRCT), respectivamente. La sobrevida porcentual sin IRCT fue de 100% a los 35 años, 45% a los 55 y 15% por encima de los 80 años. Dos subpoblaciones pudieron definirse (<ó= y > 55 años). La VdP fue -0.079 ± 0.01 (n=22) en <ó= 55 años y -0.041 ± 0.01 (n=18) en > 55 años (P<0.01). La edades de comienzo de la progresión en cada grupo fueron 42.51 ± 1.32 y 61.01 ± 2.14 (P<0.01), respectivamente. La tensión arterial media fue de 110.96 ± 2.21 y 112.32 ± 2.44 , respectivamente (P NS). En conclusión: 1) la proporción de IRCT en PRAD es significativamente superior al 50% y 2) a edades mayores de 55 años, tanto la edad de comienzo de la insuficiencia renal crónica como la VdP indican un mejor pronóstico. Estos datos podrían ser de utilidad al establecer el pronóstico y al evaluar futuros tratamientos en esta enfermedad.

431. Regulación del metabolismo de la dopamina renal por la Angiotensina II. Alicia H. Correa(1), Marcelo R. Choi(1), Pablo Schwartz(1), María L. Jousse(1), Belisario E. Fernández(2).

(1)Facultad de Farmacia y Bioquímica (2)Facultad de Farmacia y Bioquímica-CONICET
mailto:befernan@ffyb.ar.com

La excreción del sodio es regulada por la angiotensina II (ANG), el ANF y la dopamina (DA). Vimos que la ANG inhibe la captación de DA en el nefrón. Objetivos: Determinar el receptor, el mensajero y ver si afecta la liberación y turn-over de DA. Se incubaron cortes de corteza renal in vitro con 3H-DA. Se estimuló con ANG 100nM con bloqueo de captación neuronal. Resultados (dpm.g.10.5 ± ES), n=4-15; * p<0.05vs control (C); #vsCa-free. (Student-ANOVA-Tukey-Kramer). El efecto de ANG es vía el receptor AT1, inhibido por losartan 1µM (C:11,18± 0,24 vs ANG 100nM: 4,96±0.14 * vs ANG+Los: 10,88±0,23) y en medios privados de sodio pero no de calcio (C: 9,90±0,31 vs Na-free: 6,17±0.46* vs ANG+Na-free: 5,69± 0,52*; Ca-free: 6,85±0,58* vs ANG+Ca-free: 3.80 ±0,10#). El análogo 8 Br-AMPC reproduce el efecto (C: 10,79±0,47 vs ANG: 8,74±0,55 vs 8Br-AMPC: 5,15±0,47

vs ANG+8BrAMPC: 3,56±0,46). La liberación de DA fue tipo extraneuronal no exocitótica, no fue afectada por ANG II, que aumentó el turn-over de DA (pendiente: C-5,9±0,11vs ANG-2,98±0.01*. Conclusiones:1) la captación de DA en riñón es extraneuronal y regulable por ANG que la inhibe vía receptor AT1 y AMPc; 2) Es sodio, calcio dependiente. 3) la secreción de DA es ANG-independiente; 4) parte de la antinatriuresis de la ANG se produce disminuyendo la disponibilidad de DA con subestimulación del receptor D1 y desinhibición de la Na+, K+ ATPasa. La alteración de estos sistemas en la hipertensión arterial puede contribuir a la retención salina.

432. Rol de Angiotensina II y los receptores AT1 sobre la expresión de fibronectina (FN) en corteza renal y función renal en ratas con isquemia de 40 minutos y 24 hs de reperfusión. Andrés H. Barrilli(1), Elena J. Ochoa(2), Alejandra B. Quintana(3), Edgardo E. Guibert(4), María M. Elías(5).

(1)Beca «Carrillo-Oniativia»- MSP (2)IFISE-CONICET (3)Morfología-Facultad de Cs. Bioq. y Farm.-UNR (4)Biología Molecular- Fac. Cs Bioq y Farm.-UNR- CONICET (5)Farmacología- Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR- CONICET
mailto:melias@fbioyf.unr.edu.ar

Se describe la evolución de la función renal, expresión de FN en corteza renal de ratas controles e isquémicas tratadas con losartán (L) i.p. en dosis de 0, 40 y 80 mg/kg/día durante 3 días incluyendo el día de instalación de la isquemia por clampeo de la arteria renal izquierda. Después de 24 horas de reperfusión, en jaulas metabólicas con recolección de orina, los animales se anestesiaron, se exanguinaron y se extrajeron los riñones y se separaron las cortezas de las médulas. Se midieron BUN y I VFG y las excreciones de agua, electrolitos y proteínas. En los homogenados de corteza y médula se midió la abundancia de FN por Western Blot y la actividad de proteasas por zimografía en geles de gelatina. Los parámetros funcionales se deterioraron respecto a los controles después de la reperfusión (VFG, ml/min/100g; C=1.20±0.09, n=10; Isq +R =0.23±0.02), la abundancia de FN en corteza renal fue mayor en los riñones con Isq+R (100% vs C) a los Isq.(40% vs C). La administración de L (40) no evitó el deterioro de la función renal medida por técnicas de clearance. Por otro lado, L no modificó significativamente las actividades de metaloproteasas en cortezas de los riñones evaluadas por zimografía. Estos resultados indicarían que AngII condicionaría la expresión de proteínas de matriz sin evitar el daño funcional en este modelo de isquemia-reperfusión.

433. Evolución de la expresión y abundancia de fibronectina (FN) en un modelo de isquemia y reperfusión en riñón de rata. Guillermo Petri(1), Andrés H. Barrilli(2), Esteban Serra(3), Elena J. Ochoa(4), María M. Elías(5).

(1)Farmacología- Facultad de Cs Bioq. y Farmacéuticas. UNR. (2)Beca «Carrillo-Oñativia» (3)Parasitología- Facultad de Cs Bioq. y Farmacéuticas. UNR.- IBR- CONICET (4)IFISE- CONICET (5)Farmacología- Facultad de Cs Bioq. y Farmacéuticas. UNR. CONICET
mailto:melias@fbioyf.unr.edu.ar

El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de fibronectina (FN) por células del tubo contorneado proximal ante un daño isquémico unilateral seguido por un período de reperfusión. Se estudió la expresión del FN-mRNA en túbulo proximales aislados por digestión con colagenasas posterior separación en gradiente de Percoll, de riñones controles (C), con isquemia de 40 minutos (I) y con isquemia de 40 min. seguidos de 24hs de reperfusión (IRE). Un grupo adicional de ratas de los mismos grupos fue utilizado para la detección de FN en homogenados de corteza renal y para la determinación de la función renal por medición de la urea plasmática y por técnicas de clearance. Los resultados indican que si bien los niveles de FN-mRNA en túbulo aumentan después de la isquemia, los IRE no se diferencian de C. Por otro lado las abundancias de FN en

homogenados son diferentes siendo $C < I < IRE$. La función renal permanece alterada (VFG, ml/min/100: $C = 1.2 \pm 0.09$, $n=7$; $IRE = 0.30 \pm 0.02$, $p < 0.01$). Estos datos indican una correlación entre función renal y presencia de FN en un episodio muy temprano de daño isquémico. La normalización de la expresión de FN en los túbulos manteniendo niveles aumentados de la proteína, podría indicar una falta de respuesta adecuada de la degradación.

434. Activación de calpaina en células corticales aisladas de rata incubadas con paracetamol (APAP). Laura Trumper(1), Gabriela Coux(2), Liliana A. Monasterolo(3), Verónica M.C. García(3), María M. Elías(3).

(1)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. CIUNR (2)Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (3)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR

Anteriormente hemos caracterizado las acciones nefrotóxicas de APAP. Calpaina es una proteasa que fue involucrada en el daño celular por algunos tóxicos. Existe en el citosol como proenzima inactiva y se transloca a la membrana en presencia de Ca^{2+} donde encuentra a sus sustratos preferenciales. Nuestro objetivo fue analizar si calpaina esta involucrada en el daño renal inducido por APAP. Se trabajó con una suspensión de células corticales aisladas (Bertorello A.M. J. Cell Sci, 101:343, 1992) incubadas durante 30 minutos en condiciones controles y con paracetamol 1 (APAP1) y 10 mM (APAP10). La actividad de calpaina se midió en membranas celulares aisladas según una modificación de la técnica de Edelman (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 92:7662, 1995), utilizando el sustrato fluorogénico N-succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC. Se determinó la actividad como la diferencia entre la fluorescencia Ca dependiente e independiente. En APAP10 la liberación de lactato deshidrogenasa fue menor del 12%. En los controles la actividad de calpaina fue $= 0.23 \pm 0.06$ nmol AMC/min.mg prot. Los resultados obtenidos luego de la incubación se expresaron como % respecto del control de cada set de experimentos. APAP aumentó la actividad de calpaina (APAP1 = 155 ± 9 %, APAP10 = 153 ± 10 %, $p < 0.05$ comparado con el control, $n=4$). La activación de calpaina sin evidencias de deterioro en la integridad de la membrana celular sugeriría un rol para esta proteasa en el inicio del daño inducido por APAP.

435. Diferencia ligada al sexo en la fluidez de membrana y en la expresión del transportador de aniones orgánicos (OAT1) en riñones de ratas Wistar adultas. Anabel Brandoni(1), Jorgelina A. Cerrutti(1), Nora B. Quaglia(1), Adriana M. Torres(2).

(1)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (2)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Univ. Nacional de Rosario. CONICET. mailto:adorres@fbiof.unr.edu.ar

Estudios previos indicaron diferencias ligadas al sexo en la depuración de aniones orgánicos. Se estudiaron los parámetros cinéticos del transporte del ácido paraminohipúrico (PAH) en vesículas de membrana apical (BBMV) y basolateral (BLMV) de células renales de ratas Wistar machos (M) y Hembras (H). Se observó en BBMV que las H presentaban un mayor K_m y en BLMV una menor V_{max} y menor K_m . El objetivo de este trabajo fue evaluar la fluidez de membrana en BLMV y BBMV y la expresión del transportador de aniones orgánicos (OAT1). La fluidez de membrana se analizó mediante la técnica de polarización de fluorescencia determinando la anisotropía (r) y la expresión de OAT1 se evaluó empleando Western Blot. Las BBMV provenientes de H mostraron menor 'r' (H: 0.1897 ± 0.0012 ; M: 0.2003 ± 0.0014 , $P < 0.05$, $n=3$). En las BLMV no se observaron diferencias de 'r' (H: 0.1951 ± 0.0025 , M: 0.1948 ± 0.0038 , $n=3$). Se encontró una disminución de expresión de OAT1 en las hembras (40% inferior a la observada en machos). Conclusiones: la menor expresión de OAT1 en BLMV de las hembras, explicaría la menor V_{max} en el transporte de PAH. La mayor fluidez de membrana observada en

BBMV de las hembras podría determinar la menor afinidad para el transporte de PAH. Las diferencias previamente descritas, podrían justificar, al menos en parte, la menor carga secretada de PAH observada en hembras respecto de los machos, como se describió en trabajos anteriores.

436. Efectos de intoxicación crónica con aluminio (AL) sobre el transporte de aniones orgánicos en cortes de corteza renal de rata. Marisa Gionotti(1), Néstor Millen(1), María M. Elías(2), Elena Carrera(3), Stella T. Mahieu(1).

(1)Fisiología Humana.Fac Bioquímica y Cs Biológicas. UNL (2)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (3)Dpto Matemáticas. Fac Bioquímica y Cs Biológicas. UNL mailto:melias@fbiof.unr.edu.ar

En trabajos previos se observó un aumento en la absorción máxima de fosfato en túbulo renal de ratas intoxicadas crónicamente. El objetivo de este trabajo fue analizar si este fenómeno se asocia a cambios en otros mecanismos de transporte renal. Se propuso estudiar el transporte de aniones orgánicos (PAH) tanto en su capacidad de acumularse en cortes de corteza renal (S/M), y su cinética de captación ([PAH]t vs [PAH]m), en condiciones de aerobiosis y bajo atmósfera de N_2 , utilizando cortes de corteza renal. Además se midió la distribución de los compartimientos acuosos y la concentración intracelular de Na^+ y K^+ . Se trabajó con ratas adultas intoxicadas (3 meses, $n=10$, T; 0.5 mg Al/100g, ip, 3 veces por semana) y 20 controles, C. Los resultados indican una disminución significativa de S/M ($C = 3.06 \pm 0.02$, $n=25$; $T = 2.26 \pm 0.04$, $n=12$, $p < 0.001$). La velocidad de captación de PAH disminuyó significativamente en T en aerobiosis, pero no mostró diferencias bajo N_2 . No se modificaron ni el espacio de agua total ($C = 80 \pm 0.2$) ni el de inulina ($C = 0.31 \pm 0.002$) como tampoco los contenidos de Na^+ ni K^+ . Estos resultados sugieren una modificación del mecanismo de transporte de aniones orgánicos no ligado a modificaciones en la distribución de agua y electrolitos, pero que requiere energía.

437. Respuesta de la vasculatura renal de ratas diabéticas a noradrenalina (NA) en presencia de enalapril (ENA). Verónica M.C. García(1), Liliana A. Monasterolo(1), María M. Elías(1).

(1)Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. mailto: melias@fbiof.unr.edu.ar

Anteriormente hemos descrito que la vasculatura renal de ratas tratadas con aloxano (150 mg/kg, s.c. 7 días antes del estudio) posee mayor sensibilidad a NA y mayor respuesta a angiotensina II (ANG), y que prazosin revierte la respuesta a ANG y losartán disminuye la mayor sensibilidad a NA. Estos resultados no se observaron en los riñones controles. En este trabajo se profundizó el estudio de la relación entre el sistema renina-angiotensina y el noradrenérgico en este estado diabético. En el modelo de riñón aislado y perfundido se agregaron dosis crecientes de NA (0.25-50 nmol) y se registraron variaciones de presión de perfusión manteniendo el flujo constante, en presencia de ENA 1 μM . ENA no modificó la respuesta en los controles (C), mientras que en diabéticos (D) la curva mostró un aumento significativo de la dosis efectiva 50. (DE50 nmol: C: 7.8 ± 0.6 $n=5$; C+ENA: 5.9 ± 0.9 $n=6$; D: 3.4 ± 0.2 $n=5$ * $p < 0.05$ respecto a C; D+ENA: 5.1 ± 0.5 $n=4$ * $p < 0.05$ respecto a D). Las respuestas máximas fueron similares en todos los grupos. Estos datos indican que en este estado diabético la respuesta vascular renal a NA requiere la integridad de la vía renina-angiotensina, siendo la acción de ANG intrarrenal sobre receptores AT1 el posible mecanismo involucrado en dicha respuesta.

438. Rol de Angiotensina II y los receptores AT1 sobre la expresión de fibronectina (FN) en corteza renal de rata durante un periodo de isquemia de 40 minutos. Andrés H. Barrilli(1), Ester Saball(2), Marcela Salvarrey(2), María M. Elías(3).

(1)Beca «Oñativia-Carrillo». MSP (2)Inmunología - Fac. Cs Bioq. y Farm.- UNR (3)Farmacología- Fac. Cs. Bioq. y Farm.-UNR-CONICET
 mailto: melias@fbioyf.unr.edu.ar

Este trabajo se realizó a los fines de estudiar los posibles mediadores de la expresión de FN descripta en riñón durante la instalación de 40 minutos de isquemia total. En ese sentido se trabajó administrando losartán (L), a ratas controles (C) e isquémicas (Isq) que recibieron la droga i.p en dosis de 0, 40 y 80 mg/kg/día durante 3 días incluyendo el día de instalación de la isquemia. La isquemia unilateral se logró clampeando la arteria renal izquierda. Al final del experimento se tomó una muestra de sangre para determinar los niveles de BUN y los riñones fueron separados antes de liberar el clamp y la corteza y médula se homogenizaron en un medio conteniendo inhibidores de proteasas. A los fines de la comparación semicuantitativa las muestras fueron sembradas en una misma corrida electroforética como C, C+L, C+2L, Isq, Isq+L, Isq+2L. BUN no se modificó en C(n=10), C+L (n=5) y C+2L (n=6) (0.24 ± 0.01 g/l), en Isq el valor fue de 0.42 ± 0.01 , n=12, $p < 0.001$ vs C, Isq+L1 fue de 0.265 ± 0.01 (n=5, $p < 0.001$ vs Isq). Igual respuesta se vió en Isq +L2. Los resultados de los Western de FN indicaron que Isq > C y que el tratamiento con L bajó la expresión de la misma a valores comparables a C y aún menores en la dosis mayor. Estos datos están a favor de una participación de AngII sobre receptores AT1 en el estadio isquémico estudiado.

439. Desarrollo postnatal de la médula renal en ratas Wistar. María G. Márquez(1), Isabel Cabrera(2), Diego J. Serrano(3), Norma B. Sterin-Speziale(1).

(1)Cátedra de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIFIB-CONICET (2)Cátedra de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. (3)Cátedra de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA
 gmarquez@ffyb.uba.ar

El riñón de los mamíferos se encuentra poco desarrollado al nacimiento. La corteza y la papila completan su desarrollo al destete. En éste trabajo se estudió el desarrollo postnatal de la médula renal en ratas Wistar. Se identificaron las células en proliferación por la expresión nuclear de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) por inmunohistoquímica (células+ en 10 campos, X±ES, n=5). Resultados: Al nacimiento se observan islas de estructuras tubulares en un abundante intersticio, no diferenciándose la zona medular externa de la interna. La proliferación celular del compartimiento tubular es muy activa desde el día 2 (316 ± 22) hasta el día 10 (335 ± 64). A partir del día 11 se distingue la zona medular externa de la medular interna siendo más activa la proliferación en la zona externa que en la interna (381 ± 38 vs 138 ± 33), decayendo progresivamente en ambas zonas hasta la edad adulta (5 ± 1 y 1.7 ± 0.6). La estructura histológica característica del riñón adulto se observa a los 30 días distinguiéndose la franja externa y la franja interna de la zona medular externa. El evento principal a los 5 y 11 días es la remodelación de la matriz extracelular que rodea los túbulos colectores para permitir su crecimiento, con disminución de la proliferación celular (7 ± 2 y 186 ± 29). Conclusión: La morfogénesis renal progresa en forma convergente puesto que la corteza y la papila completan su desarrollo antes que se distinga la franja externa de la interna en la zona medular externa.

440. Detección del cotransportador sodio-glucosa renal (SGLT2) de rata con isotiocianato de fluoresceína (FICT). Mónica P. Majowicz(1), Laura V. González Bosc(1), María D.C. Ortiz(1), María F. Albertoni Borghese(1), María F. Delgado(1), Norberto A. Vidal(1).

(1)Cátedra de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.
 mailto:mmajow@ffyb.uba.ar

FICT es un reactivo fluorescente usado para estudiar cambios conformacionales en proteínas. FICT y su análogo no fluorescente,

isotiocianato de fenilo (PICT) se unen a grupos épsilon-amino de Lys. Se usó FICT para marcar el SGLT en vesículas de membrana apical de corteza renal (V) de ratas Wistar machos. PICT se usó para marcar grupos amino inespecíficos en presencia de Na+ y glucosa (glu). Las V se pretrataron 30 min a temperatura ambiente con PICT 2mM en buffer pH 9.2 (VPICT). Las V se recuperaron por centrifugación 23000rpm 30 min. Se incubaron 15 min a 22°C en oscuridad según: A) VPICT + FICT50 uM; B) VPICT + CINA 100mM + glu 10 mM + FICT50 uM. Se centrifugó 30 min a 23000rpm y se realizó un SDS-PAGE con las VA y B. El gel se reveló bajo luz UV a 490nm y se cuantificó la fluorescencia. En B aumentó la intensidad de las bandas marcadas con FICT (medida como densidad óptica máxima) en un 87% con respecto a A ($p < 0.05$). La posición de la principal banda marcada con FICT y estimulada por sustratos corresponde a un PM aparente de 72kD. Esto demuestra que existen diferencias funcionales entre el cotransportador Na+-glu intestinal (SGLT1) y el SGLT2. Mientras que en el SGLT1 la marcación por FICT se protege en presencia de sustratos a pH 9.2, en el SGLT2 la marcación con FICT es estimulada en presencia de sustratos. Es probable que los sustratos provoquen un cambio conformacional exponiendo residuos ocultos que puedan ser reconocidos por el FICT.

441. Asociación de Perindopril más Indapamida controla el daño renal en la rata Zucker fa/fa. Jorge E. Toblli(1), Graciela DeRosa(2), Gabriel Cao(2), Pablo Piorno(1).

(1)Laboratorio de Medicina Experimental Hospital Alemán.
 (2)Departamento de Patología Hospital de Clínicas.
 mailto:jtoblli@hospitalaleman.com

Diabetes tipo II, obesidad e hipertensión se asocian con deterioro de la función renal por múltiples factores. Nuestro objetivo fue valorar utilidad de un IECA + diurético (perindopril (PER) + indapamida (IND) (PTX) en la protección del daño estructural renal mediante análisis morfométrico en ratas Zucker (OZR). Machos OZR de 10 semanas, G1(n= 8)= OZR+PTX. y G2(n= 8)= OZR. Durante 6 meses G1 con PTX 1mg/kg/día por sonda. (ratio IND/PER 0,32), y G2 vehículo. Se evaluó: Presión arterial sistólica (PAS), Clearance de creatinina (Cl.cr.), proteinuria (Up). En tejido renal mediante ocular con grilla, retículo y fórmulas establecidas se valoró: Volumen glomerular (VG); Esclerosis glomerular (EG), % Atrofia Tubular (AT) y % Fibrosis intersticial (FI). Se aplicó test de Mann-Whitney con alfa = 0.05,

6to. mes (media ± DS)	G1 OZR+PTX	G2 OZR	p
Peso Corporal (g)	591,3 ± 55,2	551,5 ± 81,3	NS
Glucemia (mg/dl)	256,8 ± 11,2	267,7 ± 14	NS
PAS (mmHg)	128,9 ± 4	150,3 ± 3,6	<0,01
Cl.cr. (ml/min)	1,58 ± 0,14	0,93 ± 0,10	< 0,01
Up (mg/día)	27,8 ± 10,1	166,9 ± 44,3	< 0,01
VG (106 u3)	1,07 ± 0,19	1,35 ± 0,2	< 0,05
EG (Score)	17,5 ± 19,4	61,6 ± 27,3	< 0,01
AT (Score)	4,8 ± 3,3	8,6 ± 2,1	< 0,05
FI (%)	2,3 ± 1,2	5,4 ± 2	< 0,01
Peso Renal (g) ambos	3,24 ± 0,21	2,36 ± 0,30	< 0,05

Estos resultados sugieren que la asociación PTX otorga un rol protector renal a nivel estructural y funcional en este modelo de diabetes, obesidad e hipertensión.

ONCOLOGÍA V

442. Superantígenos y linfomas T murinos. Marcela Peper(1), Virginia Francisco(1), Irene Nepomnaschy(1), Isabel Piazzon(1).

(1)IILEX-CONICET. IIHEMA. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

Los superantígenos (Sag) se caracterizan por su capacidad de interactuar con cadenas variables beta (Vb) específicas del receptor T (TCR), independientemente de la especificidad del resto

de las regiones variables del mismo. Los Sag inducen la proliferación y posterior delección de las células T normales con las que interactúan. Se investigó el efecto del Sag codificado por el virus del tumor mamario murino BALB14 -específico para células T Vb14+ sobre células del linfoma T14, que expresan monoclonalmente la región Vb14. Se co-cultivaron células T14 con esplenocitos singéneos pretratados con mitomicina-C, infectados con a) BALB14; b) BALB2 (control de especificidad) o c) no infectados. La proliferación a las 18Hs medida por incorporación de timidina tritiada (media de cpm + ES ($\times 10^{-4}$) n=3) fue de a) 4.5+0.4, p<0.01; b) 1.1+ 0.1 y c) 1.0+0.1. A las 36Hs los porcentajes de células hipodiploides Vb14+ (técnicas citofluorométricas) expresados como la media del %+ES, n=3, fueron: a) 40+2, p<0.01; b) 10+1; c) 11+1. La sobrevida de ratones inoculados por vía iv con L14 fue significativamente mayor en el grupo infectado con la variante viral BALB14. Estos resultados sugieren que células del linfoma T14 proliferan y mueren por apoptosis en presencia de un Sag viral capaz de interactuar específicamente con la región Vb expresada en su TCR. Correlativamente, la expresión de dicho Sag en ratones portadores de esta neoplasia induce aumentos en su sobrevida

443. Ciclo celular y hepatocarcinogénesis química. Paula Sacca(1), Fabiana Caballero(1), Alcira M.C. Battle(1), Elba Vazquez(1).

(1)Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, Dpto. Química Biológica, FCEN, UBA-CONICET
mailto:battle@mail.retina.ar

Los oxidantes juegan un rol importante en la carcinogénesis, induciendo cambios estructurales en genes relacionados con cáncer, citotoxicidad y muerte celular. La metabolización del p-dimetilaminoazobenceno (DAB) provoca daño peroxidativo y citotoxicidad hepática. En este trabajo estudiamos el efecto del DAB sobre la regulación del ciclo celular y analizamos la capacidad citoprotectora del ácido acetilsalicílico (ASA). Ratones CF-1 recibieron DAB (0,5% p/p) en el alimento durante 35 días y luego una dieta estándar de laboratorio (DSL) por 63 días. Los controles recibieron DSL durante 98 días. A ratones no tratados y tratados con DAB se les suministró ASA (0,16% p/p) en la dieta desde el día 36. Los niveles de ciclina D1, ciclina E, CDK4, CDK2, p21 y p53 se analizaron por western blot. El tratamiento con DAB incrementó la expresión de ambas ciclinas (D1 42% y E 55%) y de p21 (21%). No se detectaron cambios en la expresión de CDK2. El co-tratamiento con ASA revirtió a niveles basales la inducción de las ciclinas E y D1, mientras que CDK2 y p21 aumentaron (29% y 86% respectivamente). El oncogen p53 permaneció sin cambios y CDK4 disminuyó en todos los grupos. La sobreexpresión de ciclina E y de p21 refleja un arresto en G1 por efecto del carcinógeno. La alteración en la relación ciclina D1/CDK4 provocada por DAB, es una característica común en cáncer. Nuestros resultados sugieren que ASA podría actuar como citoprotector hepático en la iniciación de la carcinogénesis química.

444. Acido aminolevúlico y sus derivados en la Terapia Fotodinámica de celulas tumorales murinas. Christian P. Perotti(1), Adriana G. Casas(1), Haydée Fukuda(1), Alcira M.C. Battle(1).

(1)Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, CONICET y FCEyN, UBA
mailto:chpp@yahoo.com

La Terapia fotodinámica de tumores (TFD) a partir de ácido 5-aminolevúlico (ALA) es un tratamiento antineoplásico basado en la fotosensibilización de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA. Los ésteres derivados de ALA, por su mayor hidrofobicidad, podrían aumentar su incorporación a las células y consecuentemente la síntesis de porfirinas. Se emplearon las líneas celulares LM2, LM3 y su derivada LM3-SNP resistente al óxido nítrico (NO) (IOAHRoffo), para investigar la eficiencia del ALA y sus derivados Hexil-ALA (He-ALA) y Metil-ALA (Me-ALA) como profotosensibilizantes, y la acción del NO en la TFD. En concen-

traciones óptimas LM3 fue la línea que más porfirinas sintetizó (ALA=240 ng/10x5 cél; He-ALA=195; Me-ALA= 160), seguida por LM3-SNP y LM2. Las líneas más productoras de porfirinas fueron las más susceptibles a la fotosensibilización. La presencia de NAME 1mM, inhibidor de óxido nítrico sintetasa (NOS) durante y después de la iluminación parece proteger del daño fotodinámico aún en la línea LM2 no productora de NO, sugiriendo que la TFD podría estar induciendo una forma inactiva de la NOS.

445. Alteración de la relación IGF-I/IGFBP3 en pacientes premenopáusicas con enfermedad macroquística mamaria.

Pablo J. Enriori(1), Carlos R. Fischer(2), Jorge R. Gori(2), Alberto E. Etkin(3), Ricardo S. Calandra(1), Isabel A. Lüthy(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental (2)Hospital Alemán (3)Hospital Durand
calandra@ibyme.dna.uba.ar

La enfermedad macroquística mamaria es la patología benigna más frecuente en mujeres pre-menopáusicas. Aunque no son consideradas lesiones pre-neoplásicas, se ha descrito un riesgo aumentado de cáncer de mama, especialmente en pacientes con quistes de tipo I (t-I) (Br. Med. J. 314:925, 1997). Además se describió un mayor riesgo de cáncer de mama en aquellas mujeres con la relación de concentraciones séricas de IGF-I/IGFBP-3 aumentada. Se estudiaron entonces dichas concentraciones en t-I (n=20) y portadoras de quistes tipo II (t-II; n=13) y 18 controles (C) normales. Las mismas se midieron por IRMA con kits comerciales. La concentración de IGF-I fue mayor en t-I (210 ± 24 ng/ml, Media \pm SEM) que en t-II (147 ± 14 , p<0,044). Los niveles de IGFBP-3, la IGFBP más abundante, fue menor en t-I ($2,81 \pm 0,15$ ug/ml) que en C ($3,59 \pm 0,16$, p<0,002), no encontrándose diferencias entre t-I y t-II ($3,21 \pm 0,16$). La relación IGF-I/IGFBP-3, una estimación de IGF-I biológicamente activa, fue mayor en t-I ($72,6 \pm 6$ ng/ug) que en t-II ($46,9 \pm 3,9$, p<0,005) y C ($47,0 \pm 3,3$, p<0,002). La concentración sérica de IGFBP-1 fue significativamente menor en t-I que en t-II y C. La relación IGF-I/IGFBP-1 fue mayor en t-I ($7,38 \pm 1,14$) que en t-II ($3,37 \pm 0,79$, p<0,007) y C ($4,05 \pm 0,49$, p<0,005). Dado que IGF-I es mitogénico en cáncer de mama, los niveles aumentados de la relación IGF-I/IGFBP-3 en t-I podría asociarse con un mayor riesgo de cáncer de mama en este grupo.

446. Influencia del nivel de instrucción (NI) y cobertura en salud (CS) en la prevención de efectos colaterales de la quimioterapia antineoplásica (QMTA). Ignacio J. Villar(1), Mercedes Salamano(1), Silvina Bravo(1), Mónica Fioria(1), Stella M. Pezzotto(2), Leonor C. Poletto(2).

(1)Servicio de Hospital de Día. Hospital Provincial del Centenario. Rosario (2)Consejo de Investigaciones. Universidad Nacional de Rosario.

La QMTA produce efectos indeseables, influenciados por la psiquis del paciente y la contención en la atención. Se analiza si la información oral y escrita (IOE) versus información oral (IO) modifica la fatiga, náuseas y emesis (FNE) postQMTA en pacientes con cáncer de mama (CM) tratadas con doxorubicina y ciclofosfamida. Este ensayo clínico aleatorizado incluyó a las pacientes ingresadas al Servicio desde el 1/1/00 hasta el presente, dividiéndolas en dos grupos: IOE, IO. En cada ciclo se efectuó antiemesis con metoclopramida (MP) u ondansetrón (ON) según prescripción oncológica con la siguiente norma: 1) MP 60 mg endovenoso (EV) más dexametasona (DX) 8 mg EV y MP 20 mg cada 8 hs vía oral (VO) por 3-5 días. 2) ON 16 mg EV más DX 8 mg EV y MP 20 mg cada 8 hs VO por 3-5 días. Se diseñaron scores para evaluar FNE luego de cada ciclo, agrupándose los puntajes de las respuestas según el tipo de información y antiemesis. Pacientes incluidos: 30 (115 ciclos); Grupo MP (82 ciclos): 38 en IO y 44 en IOE. Grupo ON (33 ciclos): 14 en IO y 19 en IOE. No se observaron diferencias significativas en FNE según el tipo de información en el Grupo MP. Se encontraron diferencias significativas en fatiga (RR=0.34, p=0.002) y náuseas

(RR=0.57, p=0.02), no en emesis, en el Grupo ON. Se observaron además diferencias significativas en NI (p=0.0001) y CS (p=0.02) entre MP y ON. Conclusión: La IOE en pacientes con CM con un mayor NI y con CS (Grupo ON) disminuiría el riesgo de fatiga y náuseas postQMTA.

447. La histamina regula la proliferación de una línea celular de carcinoma pancreático humano. Gabriela Martín(1), Graciela Cricco(1), Mariel Nuñez(1), Claudia Cocca(1), Alicia Gutierrez(1), Vanina Medina(1), Maximo Croci(2), Rosa Bergoc(1), Elena Rivera(1).

(1)Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (2)Instituto de Inmunooncología
mailto:rmbergoc@ffyb.uba.ar

En la línea celular PANC-1 la histamina (Hi) en altas dosis y agonistas H2 (Ago2) inhiben la proliferación sin inducir apoptosis y sólo aumentan la expresión de algunos marcadores de diferenciación como la fosfatasa alcalina. Con el objetivo de profundizar los mecanismos involucrados en la acción de la Hi se realizaron estudios de proliferación, de ciclo celular por análisis de videoimágenes y determinación de PCNA por inmunofluorescencia. También nos propusimos obtener un modelo tumoral empleando ratones nude. Resultados: la Hi 0.1 uM (120%) y el antagonista H1 Pirlamina (286%) aumentan la proliferación mientras que el antagonista H1 Tripolidina no ejerce efecto (98%). La Hi 10 uM (54%) y Ago2 (58%) la inhiben. La expresión de PCNA corrobora estos datos, 100% de células positivas para Pir y sólo 50% para Ago2. No se observó aumento en el porcentaje de células en ninguna fase del ciclo celular respecto de los controles con Hi 10 uM y Ago2 a las 24 y 48 hs. Concluimos que la Hi a bajas dosis aumenta la proliferación a través de los receptores H1 y el efecto de la Pir, no observado con Tripolidina, se debe a su característica de agonista inverso. La inoculación de 3x10⁶ células en ratones nude produjo tumores en un 86% (13/15), con una latencia de 14±8 días y una supervivencia de 71±30 días desde la inoculación. La histología muestra un adenocarcinoma ductal diferenciado, que conserva la morfología de las células en cultivo y resulta adecuado para estudios in vivo.

448. Parámetros de radiosensibilidad de líneas de melanoma humano. Natalia Norero(1), Vanina Medina(1), Mariel Nuñez(1), Gabriela Martín(1), Graciela Cricco(1), Claudia Cocca(1), Elena Rivera(1), Rosa Bergoc(1).

(1)Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
mailto:erivera@ffyb.uba.ar

El melanoma cutáneo ha alcanzado proporciones epidemiológicas y en muchos casos, la radioterapia constituye una importante alternativa terapéutica, sola o combinada con quimio o inmunoterapia. El objetivo de este trabajo fue determinar los parámetros de radiosensibilidad de dos líneas de melanoma humano con distinta capacidad metastásica (WM35, derivada de un melanoma primario y M1/15 de metástasis hepática). Las células se sembraron a bajo inóculo 2.000-3.000 células por frasco, por triplicado y 24 hs. después se irradiaron con Dosis de 0; 1; 1,4; 1,8; 2; 2,5; 3 y 5 Gray empleando una fuente de 137Cs de 8-8,11 Gray/min. La fracción de células sobrevivientes se evaluó contando el número de colonias con más de 50 células y empleando el programa Origin se graficaron las Curvas de Supervivencia empleando el Modelo Lineal-Cuadrático. Los parámetros de radiosensibilidad a y b fueron: para WM35, a = 0,369 ± 0,072 Gy⁻¹ y b = 0,062 ± 0,024 Gy⁻²; para M1/15, a = 0,469 ± 0,030 Gy⁻¹ y b = 0,063 ± 0,008 Gy⁻². Asimismo, la observación al microscopio óptico post-irradiación mostró células multinucleadas y con pocos cambios morfológicos compatibles con apoptosis. A través de estudios de fragmentación de ADN y citometría de flujo se corroboró que en ninguna de las líneas se puede inducir la apoptosis, aún frente a diferentes estímulos. Concluimos que ambas líneas son igualmente radiorresistentes

independientemente de su capacidad metastásica y parecen tener bloqueado su camino apoptótico.

449. Rol de la interacción CD44-ácido hialurónico en la migración de células tumorales. Marina V. Cápula(1), Glenda Ernst(1), Paula V. Cabrera(1), Guillermo Blanco(1), Elida Alvarez(1), Silvia E. Hajos(1).

(1)Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, IDEHU. UBA - CONICET
shajos@ffyb.uba.ar

La molécula de adhesión CD44 participa en eventos del desarrollo neoplásico. En este trabajo se analizó la participación de la interacción CD44-ácido hialurónico (AH) en los mecanismos de migración y diseminación tumoral. Se utilizaron dos líneas celulares derivadas de una leucemia T murina que presentan diferente comportamiento invasivo. Se estudió la capacidad de unión a AH de alto (a) y bajo (b) PM y se evaluó la actividad de metaloproteasas. Las células LBLa pero no las LBLc mostraron diferencias significativas con respecto a la adhesión a AHb o a AHa: 48% vs. 20.3% (p<0.05). Utilizando cámaras de quimiotaxis ambas células migraron hacia HA, LBLa mostró un índice de migración mayor hacia AHb que hacia AHa (2.6 ± 0.1 vs 1.3 ± 0.1) (p<0.001). Ambos procesos fueron inhibidos por Mabs anti CD44 y por hialuronidasa. La adhesión a fibronectina (FN) mostró que las células LBLa se unieron más que las LBLc 81 ± 12 vs 41 ± 1 (p<0.01). En ensayos de quimiotaxis la unión de LBLa fue inhibida por Mabs anti-CD18 pero no por anti-CD44. La capacidad invasiva de LBLa en matrigel fue inhibida por ambos anticuerpos. La actividad gelatinolítica de MMP-9 y MMP-2 fue mayor en sobrenadantes y extractos de membrana de LBLa. Los resultados obtenidos demostraron que LBLa expresa moléculas de adhesión que participan de la migración a través de la interacción con AHb y FN y un nivel de actividad de MMP superior a LBLc concordando con su mayor capacidad invasiva previamente determinada.

450. LM-234p, una nueva línea celular derivada de un adenocarcinoma mamario murino Esteban N. Gurzov(1), M.Mercedes Binda(2), Graciela O. Scharovsky(3), R.Daniel Bonfil(4).

(1)CEFYO, CONICET, Buenos Aires e Instituto de Genética Experimental, Fac. Cs. Médicas, UNR, Rosario (2)CEFYO, CONICET, Buenos Aires (3)Instituto de Genética Experimental, Fac. Cs. Médicas, UNR, Rosario (4)CEFYO, CONICET, Buenos Aires
mailto:ogs@citynet.net.ar

A partir del tumor mamario murino M-234p, de origen espontáneo en una hembra BALB/c y mantenido por pasajes sc seriados en la cepa de origen, se obtuvo la línea LM-234p, actualmente con más de 50 pasajes in vitro. La inoculación sc de las células demostró que las mismas mantienen su capacidad tumorigénica. Se trata de células de fenotipo epitelioide, con un tiempo de duplicación de 19 horas en la fase de crecimiento logarítmico. El estudio de la capacidad adhesiva de LM-234p al plástico, al colágeno IV y a la laminina, demostró su alta adhesividad (70% y 90% de las células adheridas a los 5 y 30 minutos de sembradas, respectivamente). El estudio zimográfico de los medios condicionados por las células LM-234p, evidenció su capacidad para secretar activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) en su forma de bajo peso molecular cadena simple, así como la ausencia de metaloproteinasas. A través del análisis por ELISA del medio condicionado por LM-234p, se ha demostrado su capacidad para secretar el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), detectándose un promedio de 310,18 pg/ml a partir de 100.000 células. El estudio cromosómico de LM-234p mostró un número modal cromosómico de 63, observándose cromosomas metacéntricos atípicos y otras anomalías cromosómicas. La existencia de este nuevo modelo para cáncer de mama podría ser de utilidad en el estudio de dicha patología a nivel experimental.

451. Acción citostática de flavonoides naturales y sintéticos en distintas líneas celulares. Cecilia Poli(1), Viviana C. Blank(1), Nora M. Marder(1), Leonor P. Roguin(1).

(1) *Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires.*
mailto:rvroguin@qb.fzyb.uba.ar

Los flavonoides son metabolitos de las plantas que ejercen diferentes acciones biológicas, tales como actividad antiviral, antiinflamatoria y antitumoral. Con el propósito de evaluar la acción antimitogénica de varios flavonoides, estudiamos el efecto de 14 flavonoides naturales y 25 derivados sintéticos sobre el crecimiento de células provenientes de un linfoma y de un carcinoma cervical (Daudi y WISH, respectivamente). Cuando se estudió el efecto antiproliferativo de los compuestos naturales, se observó un comportamiento diferente en las dos líneas celulares. Mientras que el honokiol fue el compuesto más activo en inhibir la proliferación de células WISH (IC50 14 mM), la apigenina y la quercetina fueron más efectivas en células Daudi (IC50 20mM). Entre los flavonoides sintéticos, la 2'-nitroflavona y la 2',6-dinitroflavona fueron los mejores agentes antimitogénicos tanto en células WISH (IC50 3mM) como en Daudi (IC50 20mM). Puesto que ha sido demostrada la actividad antiproliferativa del interferón-alfa2b (IFN-alfa2b) en células WISH, decidimos evaluar la acción de algunos flavonoides en presencia de IFN-alfa2b. En todos los casos ensayados se obtuvo un mayor efecto antiproliferativo, equivalente a la suma de los efectos de los componentes individuales. Los resultados obtenidos demuestran la efectividad de algunos flavonoides naturales y sintéticos como agentes citostáticos, y la mayor potencia biológica de los mismos en combinación con el IFN-alfa2b.

452. Expresión diferencial de IL-10/IL-10R en células tumorales primarias y metastásicas de un linfoma B de rata. María J. Rico(1), Pablo(ex aequo) Matar(1), Graciela O. Scharovsky(1).

(1) *Instituto de Genética Experimental, Fac. Cs. Médicas, UNR, Rosario*
mailto:ogs@citynet.net.ar

Previamente demostramos que las ratas portadoras del L-TACB presentan niveles séricos elevados de IL-10 y una marcada inmunosupresión. IL-10, producida por linfocitos T, fue el principal factor responsable de la inmunosupresión observada. Teniendo en cuenta que ciertos tumores tienen la capacidad de producir citoquinas inmunosupresoras, como IL-10, el objetivo del presente trabajo fue investigar la producción de IL-10 y su receptor específico (IL-10R) en células tumorales primarias y metastásicas del L-TACB. Se evaluó la concentración de IL-10 (ELISA) en medios condicionados de células tumorales primarias y metastásicas. Se investigó la expresión de IL-10R (CELISA) y se evaluó el efecto de IL-10 sobre la proliferación in vitro de células tumorales primarias y metastásicas. Las células metastásicas en cultivo produjeron IL-10 a razón de 526 ± 34 pg/ml/106 células; por el contrario, las células tumorales primarias no produjeron una cantidad medible de IL-10. Ambos tipos celulares expresaron IL-10R, aunque la cantidad del mismo en células metastásicas resultó significativamente superior a la de células tumorales primarias ($p < 0.001$). IL-10 incrementó la tasa de proliferación in vitro de las células metastásicas en una manera dosis-dependiente, pero no afectó la de las células tumorales primarias. En conjunto estos resultados indican que IL-10, además de su acción inmunorreguladora, se comportaría como un factor de crecimiento autocrino para células tumorales metastásicas.

453. Correlación entre la expresión de HER-2, proteína del shock térmico 27000 (Hsp 27) y receptores estrogénicos en cáncer de mama con los grados histológicos y el estado de los ganglios axilares. Graciela E. Laguens(1), Silvia Coronato(1), Vanda M.T. Di Girolamo(1).

(1) *Cátedra de Patología B de la Facultad de Ciencias Médicas UNLP*
mailto:glaguens@infovia.com

La oncoproteína HER 2 (receptor para factores de crecimiento), Hsp27 y Receptores estrogénicos (RcE) son marcadores biológicos de carcinomas mamarios. El objetivo del presente trabajo fue determinar si existe correlación entre la expresión de estos marcadores con los grados histológicos de Bloom y Richardson y el estado de los ganglios linfáticos axilares. Sobre 34 carcinomas mamarios (11 grado I, 17 grado II, 6 grado III) se realizaron técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales comerciales HER 2, Hsp27 y RcE. Las células positivas se cuantificaron y los datos se analizaron estadísticamente. Los resultados fueron los siguientes: A. Relación con el grado histológico: la expresión de HER 2 aumentó significativamente en el grado II y III ($p < 0.01$) y no se halló diferencia significativa con Hsp27 ($p = 0.39$) y con RcE ($p = 0.36$). B. Estado de los ganglios linfáticos: la expresión de HER 2 y de RcE no se correlacionó con la presencia o ausencia de metástasis ($p = 0.62$) y ($p = 0.74$) respectivamente. Se encontró diferencia muy significativa entre la sobreexpresión de Hsp27 y la ausencia de metástasis ganglionar ($p < 0.0089$). Conclusiones: HER 2 se halla asociado a tumores con mayor grado de malignidad; la Hsp27 se correlaciona con ausencia de metástasis ganglionares y el RcE es un factor independiente. Estos marcadores resultan de gran valor para conocer la susceptibilidad terapéutica del carcinoma mamario a drogas adyuvantes y predecir el curso de la enfermedad.

COMUNICACIONES ORALES

GASTROENTEROLOGÍA III

454. Bloqueo de la bomba de Na⁺/H⁺ en ratas hipertensas portales: variación de la presión arterial y portal a diferentes dosis de fenilefrina y noradrenalina. Salvador Romay(1), Francisco Eizayaga(1), Jose Castro(2), Camila Scorticati(1), Juan Prestifilippo(1), Sofía Coniglio(1), Abraham Lemberg(3), Juan Perazzo(1).

(1) *Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA* (2) *Cátedra de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA* (3) *Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA*
salvadorromay@ciudad.com.ar

INTRODUCCIÓN: La actividad de la bomba de Na⁺/H⁺ está aumentada en epitelio de colon en ratas con hipertensión portal. **OBJETIVO:** evaluar si dicha bomba influye en la hiporrespuesta a las catecolaminas observada en hipertensión portal, bloqueando dicha bomba con Etilisopropilamiloide (EIPA). **MÉTODOS:** Se utilizaron ratas Wistar machos de 200 a 250g, divididas en: G1 (n=8) estenosis reglada de la vena porta (ERVP) y GII (n=8) operación ficticia. Se canularon la arteria carótida y el bazo para el registro de las presiones arterial y portal respectivamente, conectadas mediante un transductor Statham a un polígrafo Grass. Se realizaron curvas dosis-respuesta a Fenilefrina (FEF) y Noradrenalina (NA) (0.3, 1 y 3 mcg/kg inyectadas por vía femoral, antes y después de la inyección de 2 mg/kg de EIPA. **RESULTADOS:** Presiones Portales (mmHg): G1: $14 \pm 1,8$ vs. GII: $7,6 \pm 1,9^*$. Se observó una disminución de la presión portal (mmHg) con la administración de EIPA: G1: $7,6 \pm 0,8$ y GII: $6,7 \pm 1^*$. Presiones Arteriales: Se observó un aumento significativo de la respuesta a NA luego de la administración de EIPA a las dosis de 1 ($40 \pm 0,6$ vs. $46,8 \pm 2,1$ mmHg*) y 3 mcg/kg ($54,2 \pm 3,2$ vs. $62,7 \pm 2$ mmHg*) en G1. En GII se observa solo en la dosis de 3 mcg/kg un efecto significativo ($49,6 \pm 4,4$ vs. $62,9 \pm 4,9$ mmHg*). (* $p < 0,05$). **CONCLUSIONES:** El EIPA pone en evidencia que el intercambiador de Na⁺/H⁺ podría ser uno de los mediadores de la baja respuesta a catecolaminas observada en la hipertensión portal.

455. Transporte hepático de xenobióticos conjugados en la colestasis aguda inducida por 17-glucurónido de estradiol (17GE). Aldo D. Mottino(1), Jingsong Cao(2), Luis M. Veggi(1), Mary Vore(2).

(1)Instituto de Fisiología Experimental. CONICET - Universidad Nacional de Rosario (2)Graduate Center for Toxicology, University of Kentucky
mailto:ifise1@citynet.net.ar

La administración de 17GE representa un modelo de colestasis aguda por estrógenos en la rata. Usualmente el flujo biliar muestra una caída máxima (80-90 %) a los 20 min de administrar 17GE, se recupera en un 50 % a los 75 min y totalmente a los 180 min, sugiriendo un proceso reversible. En este trabajo se analizó la localización del principal transportador canalicular de xenobióticos conjugados, conocido como proteína resistente a multidrogas 2 (mrp2) y el transporte hepatobiliar de uno de sus principales sustratos, el glutation-S-dinitrofenol (GS-DNF) a los 20, 75 y 180 min después de administrar 17GE (15 $\mu\text{mol/Kg}$ peso) i.v. A ratas hembras adultas. El contenido de mrp2 en microsomas, analizado por densitometría de los western blot correspondientes, aumentó a los 20 y 75 min en un 70-80 % respecto de los controles (solvente del 17GE) ($p < 0.05$), siendo normal a los 180 min. El transporte acumulativo de GS-DNF en bilis, luego de administrar una dosis única (10 $\mu\text{mol/Kg}$) de su precursor CDNB, disminuyó a los 20 y 75 min en un 30-40 % respecto de los controles ($p < 0.05$) siendo normal a los 180 min. El aumento del contenido de mrp2 en microsomas a los 20 y 75 min sugirió endocitosis del transportador, lo que fue confirmado por estudios de microscopía confocal analizando mrp2 y un marcador canalicular. Se concluye que la administración de 17GE promueve la deslocalización de mrp2 de la membrana plasmática, afectando la secreción a bilis de xenobióticos conjugados.

- 456. Modulación por cascadas de señalización intracelular de la necrosis inducida por sales biliares (SB) hidrofóbicas en hepatocitos aislados de rata (HAR).** Mariana Borgognone(1), Fernando A. Crocenzi(1), Elena J. Ochoa(1), Emilio A. Rodríguez Garay(1), Marcelo G. Roma(1).

(1)Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) - CONICET - Fac. de Cs. de Bioq. y Farmacéuticas, UNR
mailto:fcrocen@fbioyf.unr.edu.ar

Analizamos el efecto de la modulación de vías de señalización intracelular dependientes de Ca^{2+} , PKA y PKC sobre la lisis hepatocelular inducida por la SB hidrofóbica tauroquenosolcolato (TQDC). TQDC (0.25-1.5 mM, 2 hs) redujo, de manera dosis dependiente, el % de HAR viables (test de azul de tripán) y aumentó la liberación de enzimas citosólicas (lactato deshidrogenasa, alanina aminotransferasa) y de membrana plasmática (fosfatasa alcalina). El quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA (20 μM) no atenuó este efecto. El activador de PKA dibutilil-AMPC (0.05-1 mM) exacerbó, en forma dosis dependiente, la lisis celular inducida por TQDC, un efecto probablemente debido a la estimulación mediada por PKA de la captación de SB, ya que el inhibidor de PKA KT5720 atenuó este efecto. Los inhibidores de PKC estaurosporina (1 μM), H7 (100 μM) y queleritrina (2.5 mM) previnieron parcialmente el daño inducido por TQDC. El antioxidante N,N'-difetil-p-fenilendiamina, el cual previno el estrés oxidativo inducido por TQDC (estimado utilizando diclorofluoresceína como marcador), solo previno parcialmente la lisis celular, sugiriendo otros mecanismos de daño (por ej., efecto detergente sobre membranas). Estos resultados sugieren que, a diferencia de lo que ocurre con otras formas de muerte celular, como la apoptosis, la lisis hepatocelular inducida por SB es solo parcialmente dependiente del estrés oxidativo e influenciada por vías de señalización que afectan la disponibilidad hepatocelular de SB.

- 457. Glucagon estimula la inserción del canal de agua aquaporina-8 (AQP8) en la membrana plasmática del hepatocito.** Fabiana García(1), Sergio A. Gradilone(1), Robert Hubert(2), Pamela Tietz(2), María C. Larocca(1), Arlinet Kierbel(1), Nicholas LaRusso(2), Raúl A. Marinelli(1).

(1)Instituto de Fisiología Experimental (IFISE - CONICET). Universidad Nacional de Rosario. (2)Center for Basic Research in Digestive Diseases, Mayo Clinic, EE.UU.
mailto:fgarcia@fmedic.unr.edu.ar

Previamente demostramos que AQP8 se expresa en hepatocitos, se localiza principalmente en vesículas intracelulares y que su translocación hacia la membrana plasmática es inducida por dibutilil AMP cíclico (JBC 276:12147, 2001). Los hepatocitos elaboran la secreción biliar canalicular, la cual es estimulada por la hormona dependiente de AMP cíclico, glucagon. Nuestro objetivo fue analizar si glucagon estimula la translocación vesicular de AQP8 en hepatocitos. Hepatocitos aislados de rata se incubaron en ausencia y presencia de glucagon (1 μM , 10 min). Se prepararon fracciones subcelulares enriquecidas en membranas plasmáticas e intracelulares y se analizó AQP8 por inmunoblotting cuantitativo. Hepatocitos tratados con glucagon presentaron una disminución intracelular (-38 % $p < 0,05$ $n=3$) y un aumento en membrana plasmática (+102 % $p < 0,05$ $n=3$) de AQP8. Estos resultados fueron confirmados por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Estudios funcionales mostraron que glucagon produjo un aumento de la permeabilidad al agua de la membrana plasmática (+86 % $p < 0,05$ $n=3$), el cual fue bloqueado selectivamente por el inhibidor de aquaporinas dimetilsulfóxido. Conclusión: Glucagon estimula la translocación vesicular de AQP8 a la membrana plasmática del hepatocito, incrementando así su permeabilidad al agua. Este mecanismo podría cumplir un rol central en la regulación hormonal de la secreción biliar canalicular.

- 458. Silibinina (Sil) previene la falla secretora y la redistribución del transportador canalicular de sales biliares (BSEP) inducida por taurolitocolato (TLC) en duplas aisladas de hepatocitos (DAH).** Fernando A. Crocenzi(1), Emilio A. Rodríguez Garay(1), Roger Coleman(2), Marcelo G. Roma(1).

(1)Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) - CONICET - Fac. de Cs. de Bioq. y Farmacéuticas, UNR (2)School of Biosciences, The University of Birmingham, U.K.
mailto:fcrocen@fbioyf.unr.edu.ar

Silimarina previene 'in vivo' la colestasis inducida por TLC, mejorando el manejo hepático de sales biliares (SB). Dado que TLC induce pérdida de BSEP de la membrana canalicular, en este trabajo indagamos si silimarina ejerce su efecto protector impidiendo dicha redistribución. TLC (1-5 μM) disminuyó, en forma dosis dependiente, el % de DAH que acumularon en su vacuola canalicular la SB fluorescente colil-lisifluoresceína (CLF); Sil (componente activo de la silimarina, 2.5 μM) previno totalmente (hasta 2.5 μM) y parcialmente (hasta 5 μM) esta alteración. La prevención por Sil fue bloqueada por el quelante de Ca^{2+} BAPTA, pero no por el inhibidor de PKA KT5720 (% de DAH acumulando CLF, referidas al control: TLC (2.5 μM): 51 \pm 3*; TLC+Sil: 93 \pm 6*; TLC+BAPTA+Sil: 47 \pm 1*; TLC+KT5720+Sil: 92 \pm 3*; * $p < 0.05$ vs. control, ° $p < 0.05$ vs. TLC). Ninguno de los inhibidores modificó 'per se' la acumulación de CLF, ni su disminución por TLC. La redistribución de BSEP inducida por TLC desde la membrana canalicular hacia vesículas intracelulares, visualizada por inmunohistoquímica de fluorescencia, fue casi totalmente prevenida por Sil (contenido canalicular de BSEP, expresado como % del contenido total: Control: 70 \pm 2; Sil: 67 \pm 2; TLC: 29 \pm 2*; Sil+TLC: 58 \pm 2**; * $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ vs. TLC). Los resultados sugieren que Sil previene la falla secretora de SB inducida por TLC, impidiendo la redistribución de su transportador canalicular, a través de un mecanismo dependiente de Ca^{2+} .

- 459. Taurolitocolato (TLC) altera selectivamente el transporte de sales biliares a nivel canalicular, redistribuyendo su transportador (BSEP): Estudios 'in vivo' y en duplas aisladas de hepatocitos (DAH).** Fernando A. Crocenzi(1), Emilio A. Rodríguez Garay(1), Roger Coleman(2), Marcelo G. Roma(1).

(1) *Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) - CONICET - Fac. de Cs. de Bioq. y Farmacéuticas, UNR* (2) *School of Biosciences, The University of Birmingham, U.K.*
mailto:fcrocen@fbioyf.unr.edu.ar

El mecanismo por el cual la sal biliar (SB) colestásica TLC altera la excreción de SB endógenas no ha sido dilucidado. Con el objeto de discriminar la etapa del transporte hepático de SB que se encuentra alterada, analizamos, aplicando el modelo de Richards, la cinética 'in vivo' del transporte de la SB modelo 14C-taurocolato (14C-TC), luego de la administración de TLC (3 µmol/kg, i.v.). TLC disminuyó la constante intrínseca de transferencia canalicular de 0.137 ± 0.013 a 0.058 ± 0.008 ($p < 0.005$), sin afectar las de captación ni la de reflujo a plasma. Consecuentemente, la cantidad de 14C-TC retenido en hígado, luego de 20 min de administrado, aumentó de 2.1 ± 0.6 a 27.9 ± 5.5 dpm/µg hígado ($p < 0.01$). La afectación selectiva del transporte de SB a nivel canalicular fue confirmada 'in vitro' en DAH, ya que TLC (1-5 µM) disminuyó, en forma dosis-dependiente, el % de DAH que acumularon la SB fluorescente colilifluoresceína en su vacuola canalicular. Más aún, TLC indujo redistribución de BSEP desde la membrana canalicular hacia vesículas intracelulares, visualizada por inmunohistoquímica de fluorescencia (contenido canalicular de BSEP, expresado como % del contenido total: Control: 70 ± 2 ; TLC: 29 ± 2 ; $*p < 0.005$). La redistribución de BSEP inducida por TLC no fue debida a cambios en la organización de actina, la cual conservó su normal localización pericanalicular. Los resultados revelan que TLC altera selectivamente el transporte de SB a nivel canalicular, deslocalizando BSEP.

METABOLISMO II

460. Modelo matemático de la secreción, inactivación y clearance plasmático de alfa-2-macroglobulina (A2M) en ratas y seres humanos. Alfredo Rigalli(1), María C. Aguirre(2), Mirta N. Armendariz(2), Laura I. Pera(1), Rodolfo C. Puche(1).

(1) *Cátedra de Química Biológica. Facultad de Ciencias Médicas. UNR* (2) *Area Matemática. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR*
mailto:

La A2M es una antiproteasa normal del suero, de regulación desconocida. Usamos monofluorofosfato (MFP) como sonda para perturbar el sistema. Esta droga se liga a A2M y el complejo es captado por receptores tisulares. Partiendo de la concentración plasmática del complejo A2M-MFP se desarrolló un modelo matemático que describe el control de la concentración plasmática de A2M en ratas y seres humanos (que se omiten por razones de espacio). El modelo calcula las tasas de secreción (ks) e inactivación (ki) y de captación (kc) de la A2M. Los objetivos de este trabajo fueron: verificar la capacidad predictiva del modelo en la rata, por coadministración de ácido poliinosínico [Poli(I); inhibidor receptores] o de calcio [activador de la absorción intestinal de MFP] y obtener información de factores que influyen en las tasas mencionadas. Se administró MFP a ratas, con y sin Poli(I) o calcio. La inhibición del receptor redujo la kc (min⁻¹), sin Poli(I): 0.029 ± 0.020 (n=3), con poli(I): 0.000025 ± 0.000003 , $p < 0.05$. La presencia de poli(I) aumentó la concentración máxima de A2M-MFP: sin poli(I): 72 ± 10 uM; con poli(I): 212 ± 18 , $p < 0.05$. En presencia de calcio (50mM) aumentó la ka (min⁻¹), sin Ca: 0.028 ± 0.003 (n=4); con Ca: 0.052 ± 0.008 (n=4), $p < 0.001$. Se concluye que el modelo predice los cambios esperados de concentración de A2M y las constantes metabólicas. Las tasas de secreción e inactivación de la A2M nativa son independientes de la concentración plasmática de la proteína inactiva.

461. Enzimas tóxicas: efecto de la malnutrición proteica severa y posterior realimentación. María S. Feliu(1), Nora H. Slobodianik(1).

(1) *Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Bs.As.*
mail to: nslobo@ffyb.uba.ar

Se ha demostrado que la malnutrición proteica al destete produce severos daños en el timo. En este trabajo se analizan los efectos de la malnutrición proteica severa al destete y la posterior realimentación sobre la actividad de Adenosina Deaminasa (ADA), Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP) y 5' Nucleotidasa (5' NT) -enzimas relacionadas con el desarrollo y funcionamiento de los linfocitos T- en timo de ratas. Ratas Wistar recibieron a partir del destete (21-23 días) dieta libre de proteína hasta pérdida del 25% del peso inicial, cuadro de desnutrición severa (LP25); luego fueron realimentadas con dieta al 20% de caseína durante 9 días (R25). Como lote control se utilizaron ratas de igual edad que recibieron desde el destete dieta stock (C). Al finalizar la experiencia se extrajo el timo y fue pesado (Pt)(mg). Se prepararon suspensiones celulares determinándose la actividad de las enzimas ADA y PNP (umol de ác. úrico x 10⁻¹/P) y 5' NT (UI/P) (P=Pt/Pcorporal(g)0,75). Los resultados para LP25, R25 y C fueron: ADA: $17.0 \pm 2.6^*$, 7.5 ± 2.3 , 9.8 ± 1.5 ; PNP: $11.5 \pm 4.2^*$, 3.6 ± 0.5 , 4.3 ± 1.5 ; 5' NT: 2.3 ± 0.8 , 3.1 ± 0.9 , 2.5 ± 0.8 ; $*p < 0.01$ con respecto a R25 y C. La malnutrición proteica severa al destete afecta el funcionamiento del timo aumentando la actividad de las enzimas ADA y PNP sin alterar la actividad de la enzima 5' NT; la administración de la dieta de recuperación fue suficiente para revertir dicho efecto. Parcialmente financiado por SEC yT, UBA (TB077, B003) y Laboratorios Wiener.

462. Interrelación entre hierro, zinc y cobre en suero materno y suero de cordón umbilical arterial y venoso.. Silvia H. Langini(1), Michael D. Crane(2), Araceli Lazzari(3), Carlos R. Ortega Soler(3), María L. Pita Martín de Portela(1), Bo Lonnerdal(2).

(1) *Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.* (2) *Departamento de Nutrición. Universidad de California, Davis (USA)* (3) *Hospital Diego Paroissien, La Matanza (Buenos Aires)*
mailto:slangini@arnet.com.ar

Dada la importancia de los elementos traza para el desarrollo fetal, se estudió la concentración de hierro (Fe), zinc (Zn) y cobre (Cu) en suero materno y de cordón umbilical, arterial y venoso, en 17 mujeres primíparas asistidas por partos normales en el Hospital D. Paroissien. Edad (años) (media ± DE) 22 ± 5 ; peso (kg) 70 ± 12 ; edad gestacional (semanas) 39 ± 3 ; peso del recién nacido (g) 3241 ± 664 ; peso de la placenta (g) 558 ± 96 . Se obtuvo sangre venosa materna (M) a la internación, y sangre de cordón umbilical, arterial (A) y venoso (V), inmediatamente luego del corte del cordón. Se midió, en los sueros M, A y V: Fe, Zn y Cu (espectrofotometría de absorción atómica). Las concentraciones de Fe, Zn y Cu no fueron estadísticamente diferentes entre A y V (ug/mL): 2.77 ± 1.16 y 2.40 ± 0.56 ; 1.36 ± 0.72 y 1.16 ± 0.35 ; 0.42 ± 0.25 y 0.46 ± 0.34 , respectivamente. Fe en M (1.58 ± 0.93 ug/mL) fue menor que en A ($p < 0.01$) y que en V ($p < 0.05$); Zn en M (0.79 ± 0.37 ug/mL) fue menor que en A ($p < 0.001$) y que en V ($p < 0.01$); Cu en M (2.40 ± 0.43 ug/mL) fue mayor ($p < 0.001$) que en A y V. Zn en A correlacionó con Zn en V ($r = 0.78$; $p = 0.00037$). Ni Fe ni Cu en A correlacionó con Fe ó Cu en V. Fe, Zn ó Cu en A y V no correlacionaron con Fe, Zn ó Cu en M. Estos resultados sugieren, al parto: a) diferente distribución del Cu sérico entre madre y feto respecto a la del Fe y Zn; b) niveles de Fe, Zn ó Cu en A y V independientes de los niveles en suero materno. Financiado por UBA TB060 y B009

463. Identificación presuntiva de pacientes menopáusicas osteoporóticas (OP) mediante factores clínicos de riesgo (FR) para osteoporosis. Mario E. Morosano(1), Ana M. Masoni(1), Stella M. Pezzotto(1), Florencia Tomat(1), Fabiana Bentancur(1), Roberto Bocanera(2), Roberto I. Tozzini(1), Rodolfo C. Puche(1).

(1) *Facultad de Ciencias Médicas de la UNR* (2) *Centro de Estudios del climaterio del Hosp. Centenario de Rosario*
mailto: morosano@yahoo.com.ar

Se analizó la asociación de FR con baja densidad ósea lumbar (DEXA) en 131 mujeres (menopáusicas, caucásicas sin exposición previa a estrógenos) que fueron clasificadas en osteoporóticas (OP) y noOP, según definición de la OMS. La relación OP/noOP en mujeres con 0 a 3 FR (sin contar los cuatro comunes al grupo) fue 6/51 (sensibilidad 93%, valor predictivo negativo 91% y falsos negativos 4%). La OP/noOP para aquellas con 6 o más FR (26/6) dio una especificidad:99%, Vpositivo 94%, falsos positivos 4%. Los FR se dicotomizaron mediante análisis univariados de regresión logística para cada factor. El corte se determinó por el punto de inflexión de la curva: valores de la variable vs. log odd del resultado (OP=1, noOP=0). Los FR más significativos identificados mediante el análisis fueron: BMI<25 kg/m², Ingesta cálcica <1,2 g/d (ICa), más de 10 años de menopausia (>10M), fracturas personales (Fx), cifosis (C) y fracturas personales y cifosis (Fx+C). La fórmula siguiente, producto del análisis permite calcular la probabilidad (P) de ser osteoporótica de una determinada mujer en base a los FR seleccionados por el análisis: $\ln(P/1-P) = -3.05 + 1.11(>10M) + 2.35(BMI) - 0.58(Fx) + 0.38(C) + 1.19(ICa) + 2.75(Fx+C)$. Un grupo de 48 pacientes sirvió para la validación externa del modelo. Estos resultados sugieren que un elevado número de pacientes OP y noOP pueden ser identificados a través del diagnóstico clínico de FR. Se genera así un ahorro estimado en 40% de gastos en densitometría.

464. Interacciones óxido nítrico-paraoxonasa en lípidos modelo y HDL. Silvia Sanguinetti(1), Carlos Batthyány(2), Andrés Trostchansky(2), Horacio Botti(2), Regina Wikinski(1), Homero Rubbo(2), Laura Schreier(1).

(1)Lab. de Lípidos y Lipoproteínas- Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA (2)Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay mailto:leschreier@dbc.fyb.uba.ar

La oxidación de LDL es fundamental en el inicio y progresión de aterosclerosis. Paraoxonasa 1 (PON) es una enzima asociada a HDL, capaz de proteger a LDL y a la propia HDL de procesos oxidativos, a través de sus actividades esterasa y peroxidasa sobre fosfolípidos y ésteres de colesterol oxidados. La actividad PON depende de la presencia de un sulfidrilo libre en la cisteína-284, susceptible a oxidación por especies activas del oxígeno y nitrógeno o lípidos oxidados. El óxido nítrico (-NO) constituye un potente antioxidante de lipoproteínas, mediante la inhibición de la fase de propagación de la lipoperoxidación. En este trabajo investigamos el potencial efecto protector de actividad PON por concentraciones fisiológicamente relevantes de -NO. Se purificó PON de suero humano por cromatografía de afinidad e intercambio aniónico. Se incubaron hidropéroxidos lipídicos obtenidos mediante a) tratamiento de ácido linoleico con lipoxigenasa y b) incubación de HDL con CuCl₂, durante 15 h en presencia de PON y en ausencia y presencia del dador de -NO, NOC-18 (500 mM, correspondiente a un flujo de 60 nM.min⁻¹.NO). Se determinó la actividad peroxidasa de PON por medida espectrofotométrica de peróxidos lipídicos e hidropéroxidos de ésteres de colesterol por HPLC en fase reversa, observando un incremento significativo de actividad peroxidasa en presencia de NOC-18. La protección de PON por -NO constituiría un nuevo mecanismo antiaterogénico del -NO sobre modificaciones oxidativas de HDL.

465. Modulación de la óxido nítrico sintasa mitocondrial durante la adaptación al frío. Juan J. Poderoso(1), Paola Finocchietto(1), Daniela Converso(1), Jorge Peralta(1), Francisco Schopfer(1), María C. Carreras(1), Laura Schreier(1).

(1)Laboratorio de Metabolismo del oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires pfino@uol.com.ar

La óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) regula el consumo de O₂ por la inhibición reversible del NO sobre la citocromo oxidasa. El objetivo fue relacionar el consumo de O₂ sistémico (VO₂S) y de mitocondrias de hígado (VO₂M) de ratas Sprague-

Dawley con la expresión y actividad de mtNOS durante 24 ds de adaptación al frío. Se estudiaron 50 ratas (279 ± 39 g peso) a 4° (F) y 23°C (C). El VO₂S se midió en un sistema abierto (analyzer de O₂) y el VO₂M por polarografía. La mtNOS se detectó por Western blot con anticuerpos anti-iNOS y su actividad con 3H-citrulina. Se halló una respuesta bifásica en el VO₂S durante F: un aumento inicial (pico +38% en días 7-10, p< 0.05) o período A, seguido de recuperación en el período B. El grupo F perdió 12% de peso en A, que se recuperó en B indicando movilización inicial y ulterior depósito de grasa de acuerdo a variaciones de ácidos grasos y noradrenalina plasmáticos. En F, la ingesta se duplicó tempranamente (C: 54±4 vs F: 114±11 g/kg peso/día, p<0.05). La expresión de mtNOS y su actividad aumentaron desde el día 6 (de 50±5 a 95±8 pmoles NO/min.mg prot, p<0.05) y persistieron en B, por lo que el VO₂M fue selectivamente modulado por la disponibilidad de L-arginina o el uso de L-NMMA (inhibidor) entre 8 y 50%. Se sugiere que en F, VO₂S y VO₂M son modulados por mtNOS que modifica el balance energético de A (baja mtNOS, alto VO₂, calorígenes) a B (mtNOS elevada, VO₂ disminuido, lipogénesis).

REPRODUCCIÓN V

466. La Aminoguanidina (AG) inhibe la reabsorción embrionaria inducida por lipopolisacáridos (LPS) en ratón. Diego G. Ogando(1), Dante A. Paz(2), Elisa Cebra(1), Maximiliano Cella(1), Ana M. Franchi(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (2)Instituto de Neurociencia mailto:diegoogando@yahoo.com.ar

El óxido nítrico (NO) es beneficioso en preñez normal, pero parece ser citotóxico en la reabsorción inducida por LPS. Objetivos: Estudiar producción de NO en la preñez normal y en la reabsorción inducida por LPS; y las isoformas de NOS (NO sintasas) involucradas. Estudiar efecto de AG sobre este modelo. Métodos: Hembras Balb/c en día 7 de preñez se inyectaron con LPS 0.5 ug/g ó PBS y sacrificaron entre las 0 y 24 hs. Se removieron úteros y deciduas, y se incubaron 24 hs en DMEM. En sobrenadantes se determinó nitritos por Greiss. Se procesaron tejidos para detección de iNOS, eNOS y nNOS por western e inmunohistoquímica. Se inyectó AG 6 mg/ratón en 3 dosis para evaluar efecto sobre reabsorción. Se observó a las 6 hs la máxima producción de NO (Decidua: Ctrl: 160 ± 44 vs LPS: 429 ± 74 uM/100 mg peso húmedo; p < 0.01. Utero: Ctrl: 40 ± 24 vs LPS: 685 ± 47; p < 0.001). El western mostró aumento en la expresión de iNOS uterina y decidual; sin cambios en eNOS y nNOS. LPS produjo un aumento en la marca para iNOS en miometrio y decidua; y la infiltración de la decidua por macrófagos iNOS positivos. La AG disminuyó el porcentaje de reabsorción (Día 8: LPS: 100% vs LPS+AG:42%). Conclusiones: LPS aumenta la producción de NO en útero y decidua, mediante un aumento en la expresión de iNOS en células de miometrio y decidua, y a través de la infiltración de la decidua por macrófagos iNOS positivos.2) El NO tiene un rol clave en el proceso de reabsorción pues la AG la inhibe parcialmente.

467. Efectos de TGF-β en la regulación de la diferenciación de células de la granulosa bovinas. Mónica Fazzini(1), Griselda Vallejo(2), Vanina Trigo(3), Stella Campo(3), Lino S. Barañao(1), Patricia Saragüeta(1).

(1)Ins. de Biología y Medicina Experimental y Dto. Química Biológica, F. Cs. Exactas y Naturales, UBA (2)Instituto de Biología y Medicina Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA (3)Centro de Investigaciones Endocrinológicas mailto:monicafazzini@yahoo.com

La compleja regulación autócrina, parácrina, y/o endócrina de las células de la granulosa asegura el adecuado desarrollo folicular. El objetivo de nuestro trabajo es estudiar la interacción

entre los efectos de TGF- β 1 y la expresión de folistatina (FSP), y su papel en la diferenciación de las células de la granulosa. Para esto hemos medido los niveles de mRNA de FSP mediante RT-PCR semicuantitativa, en cultivos de células de la granulosa bovinas de diferentes estadios de diferenciación. TGF- β 1 regula la expresión génica de FSP tanto en los cultivos primarios (control: 0.07 ± 0.02 ua, TGF- β 1: 0.18 ± 0.04 ua) como en los secundarios (control: 0.13 ± 0.01 ua, TGF- β 1: 0.33 ± 0.03 ua), perdiéndose esta regulación en la línea celular BGC1 (control: 0.22 ± 0.05 ua, TGF- β 1: 0.21 ± 0.05 ua). El mismo patrón de regulación puede observarse sobre la producción de progesterona (control: 749.1 ± 102.3 ng/ml, TGF- β 1: 2444.5 ± 184.6 ng/ml). Dado que TGF- β 1 aumenta la producción de activina en células de la granulosa humanas se midió la activina total producida (A y B), mediante un ELISA de doble sitio. Los niveles de activinas en cada caso no variaron significativamente con el tratamiento (control: 3.3 ± 0.2 ng/ml, TGF- β 1: 4.6 ± 0.1 ng/ml), alcanzando niveles diferentes en cada estadio de diferenciación (primario: 4.4 ± 0.1 ng/ml, secundario: 1.1 ± 0.3 ng/ml, BGC1: 5.2 ± 0.1 ng/ml). Estos resultados sugieren que la regulación de FSP podría ser uno de los mecanismos por los cuales TGF- β 1 interviene en la regulación folicular.

468. Efectos moduladores de leptina sobre la función de células de Leydig de ratas hiperleptinémicas y normales. Andrés Giovambattista(1), Olga M. Suescun(1), Eduardo Spinedi(2), Ricardo S. Calandra(3).

(1)Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, Facultad de Ciencias Exactas UNLP (2)Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (3)Instituto de Biología y Medicina Experimental, Facultad de Ciencias Exactas UNLP
mailto:cimbic@netverk.com.ar

El producto adipocitario Leptina (LEP) modula diferentes sistemas endocrinos, entre ellos la función del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. La administración neonatal de monosodioglutamato (MSG) a ratas induce varias alteraciones metabólicas como pseudobesidad e hipogonadismo. En este trabajo estudiamos la actividad esteroidogénica y la expresión del receptor de LEP (Ob-Rb) en células de Leydig purificadas (CL) de ratas de 120 días, hiperleptinémicas (MSG) y Controles (C). Se evaluó en ambos grupos el efecto de LEP murina ($1-100$ nM) in vitro, durante 180 minutos, basal y post hCG ($0.05-100$ ng/ml). Se determinó testosterona y algunos precursores en el medio de incubación. Observamos una significativa disminución en testosterona (T), basal y post hCG, en CL de MSG vs C (0.85 ± 0.15 vs 0.43 ± 0.06 ; hCG: 9.58 ± 0.33 vs 3.49 ± 0.35 ng/105 cel, $p < 0.05$); se detectó un descenso similar en la liberación de androstenediona y 17 OH progesterona ($p < 0.05$). En el grupo C, LEP ($10-100$ nM) aumentó levemente la respuesta a hCG (0.1 ng/ml), en tanto que disminuyó significativamente el efecto estimulador sobre la liberación de T en presencia de $1-100$ ng/ml de hCG (20%). Sin embargo, los efectos de LEP encontrados en el grupo C no se observaron en CL provenientes de MSG. La semicuantificación de Ob-Rb mostró una menor (25%) expresión en MSG vs C. Nuestros resultados indican que la hiperleptinemia desarrollada en el grupo MSG podría ser un factor coadyuvante del hipogonadismo que caracteriza al modelo.

469. Inmuloalización de E, P y N-cadherinas en espermatozoides humanos y análisis funcional de su participación en la interacción con la zona pellucida humana. Andrea Lasserre(1), Fernanda González-Echeverría(2), Carina Guaragna(3), Norman Zambrano(4), Mónica H. Vazquez-Levin(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME. CONICET. (2)Fertilab. (3)Cátedra de Histología. Facultad de Veterinaria. UBA. (4)Hospital Sótero del Río. Chile.
mailto:lasserre@dna.uba.ar

Las cadherinas (cad) son glicoproteínas dependientes de Calcio que participan en eventos de adhesión celular. En este estudio se caracterizó la localización de las cad E (epitelial), N (neuronal

y P (placentaria) en espermatozoides humanos, y se evaluó su rol en el proceso de interacción espermatozoide-zona pellucida (ZP). Se utilizaron anticuerpos comerciales específicos dirigidos contra el dominio extracelular de cada cad. Anticuerpos anti-Ecad reconocieron un polipéptido de 127 kDa en extractos de proteínas epididimarias, y mostraron una localización específica de Ecad en células epiteliales del caput, corpus y cauda epididimarios. Anti-Ncad reconoció una proteína de 121 kDa en homogenato de testículo, y presentó una señal específica en los túbulos seminíferos. En ensayos de inmunocitoquímica, espermatozoides del eyaculado y capacitados mostraron diferentes patrones de tinción con los anticuerpos, con localización de las proteínas principalmente en el acrosoma, la región postacrosomal, y la pieza media. En ensayos de HemiZona (HZA), se observó una inhibición en la interacción espermatozoide-ZP luego de la preincubación de los zoides con 100 ug/ml de anti-Ecad (control: 30 ± 8 vs. anti-Ecad 17 ± 5 ; $n=6$; $p < 0,02$) o de anti-Pcad (control: 26 ± 7 vs. 14 ± 3 ; $n=6$; $p < 0,02$). Contrastando, anti-Ncad no tuvo ningún efecto sobre la unión. Estos estudios muestran, por primera vez, la localización de cad E, P y N en espermatozoides humanos, y su participación en la unión espermatozoide-ZP.

470. Proliferación y esteroidogénesis de células de granulosa humanas en cultivo: interacción entre factores de crecimiento, un agonista (Acetato de leuprolide, LA) y un antagonista (Antide, A) de GnRH. Marina C. Peluffo(1), Alejandra M. Vitale(1), Gabriela F. Meresman(1), Marta Tesone(2).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental- CONICET (2)Instituto de Biología y Medicina Experimental- CONICET, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
mailto:peluffomarina@yahoo.com

El propósito de este estudio fue investigar el efecto de factores de crecimiento (GF) y análogos de GnRH (LA y A) sobre la proliferación de células granulosa- luteínicas humanas (CGH). Las CGH fueron obtenidas de un programa de fertilización asistida y se cultivaron 48 hs en presencia de suero fetal bovino, luego de este período se cultivó en medio libre de suero con los estímulos a estudiar. Se midió la proliferación por incorporación de Timidina H3 y la producción de progesterona (P) por RIA. La insulina y el IGF-I no modificaron la proliferación celular, mientras que el EGF (100 ng/ml) produjo un aumento significativo (Basal: 1438 ± 87 ; EGF: 7556 ± 757 cpm, $p < 0.05$). El agonista de GnRH (LA 100 ng/ml) inhibió significativamente la proliferación celular estimulada por EGF (EGF: 7556 ± 757 ; LA: 1698 ± 259 cpm). El antagonista de GnRH (A: 10^{-7} M) estimuló la proliferación celular (Basal: 1438 ± 87 ; A: 6126 ± 603 cpm, $p < 0.05$) y revirtió el efecto inhibitorio de LA. La producción de P sólo se vio significativamente aumentada en presencia de A (Basal: 0.96 ± 0.03 ; EGF: 1.30 ± 0.24 ; EGF+LA: 1.10 ± 0.007 ; A: 1.85 ± 0.21 ng/ml). Resultados similares se obtuvieron con muestras de tres pacientes distintas. Se concluye que el GnRH podría ser un regulador local inhibitorio del desarrollo folicular.

471. Incremento de la actividad de la hexosaminidasa de espermatozoides humanos con la capacitación. Silvina L. Perez Martinez(1), Jorge G. Tezón(1), Patricia V. Miranda(1).

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental
mailto:silperez@dna.uba.ar

Las enzimas del espermatozoide participan activamente en la interacción con el ovocito. Estudios previos de nuestro laboratorio sugieren la presencia de Hexosaminidasa (Hex) en la membrana plasmática de los espermatozoides humanos y su participación en la unión a la zona pellúcida. En este trabajo estudiamos a la Hex de espermatozoides humanos y su comportamiento con la capacitación. Para ello, muestras de semen provenientes de donantes normospermicos fueron centrifugadas en un colchón de Dextrano o Percoll. Los espermatozoides fueron sometidos

dos a diferentes tratamientos de extracción antes o después de capacitar por 18 horas. La actividad de Hex fue medida en sobrenadante, pellet y medio de capacitación (MC) con un sustrato fluorométrico específico. La capacitación causó una redistribución subcelular de la enzima con respecto a los espermatozoides sin capacitar. Este proceso disminuyó significativamente la proporción de Hex debilmente unida al espermatozoide (73 ± 5 vs 41 ± 8 , $p < 0,01$) y generó una nueva fracción resistente al BWW pero extraíble con Trixón X100. Se encontró actividad de Hex en el MC, sin disminución de la actividad asociada a los espermatozoides, con el consecuente aumento de la actividad total (E+MC, $2,3 \pm 0,6$, $p < 0,005$). El aumento de la actividad de Hex con la capacitación sugiere una activación de la enzima y/o la aparición de nuevos sitios activos como consecuencia de este proceso.

SIST. CARDIOVASCULAR III

- 472. Interacción TRH-Leptina (Lp) como causa de la asociación entre obesidad e hipertensión arterial.** Silvia I. García(1), María S. Landa(1), Patricia I. Porto(1), Mariano Schuman(1), Azucena L. Alvarez(2), Natalia Stepat(1), Samuel Finkelman(3), Carlos J. Pirola(1).

(1)Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari. Facultad de Medicina, UBA. (2)Sustancias Vasoactivas, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari. Facultad de Medicina, UBA. (3)Hipertensión, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari. Facultad de Medicina, UBA.

mailto:cjpirola@ciudad.com.ar

La Lp regula la ingesta de alimentos y el gasto energético a través de la descarga simpática. Como la TRH es hipertensora por este mismo mecanismo, nuestro objetivo es estudiar la interacción TRH-Lp. Analizamos el efecto de la sobreproducción de TRH producida por inyección icv de un plásmido de expresión eucariota (pCMV-TRH), que produce hipertensión arterial (HTA), sobre los niveles de Lp circulante determinadas mediante EIA en ratas Wistar macho. A las 24-48hs, 100 ug del pCMV-TRH producen una disminución significativa ($p < 0,02$, ANOVA) de los niveles de Lp plasmáticos (media \pm DS, $n=4$, $19,8 \pm 5,9$ vs $28,2 \pm 5,0$ ng/ml). El cotratamiento con un oligonucleótido antisense antiTRH (AS) bloqueó este efecto ($29,2 \pm 2,5$ ng/ml). Un oligonucleótido de sentido inverso (SI) no evitó la disminución inducida por el pCMV-TRH ($11,2 \pm 4,2$ ng/ml). Como las SHR poseen una hiperactividad de TRH central, estudiamos los niveles de Lp en estos animales comparados con sus controles WKY. Observamos que independientemente del sexo, las SHR poseen ($p < 0,01$, $n=4$) menores niveles circulantes de Lp que las WKY (machos: $34,6 \pm 3,3$ vs $42,8 \pm 2,8$ y hembras: $18,5 \pm 2,1$ vs $25,9 \pm 3,7$ ng/ml). A su vez, en ratas normales, la leptina icv (10 ug) induce un efecto presor (18 ± 5 mmHg, $n=4$, $p < 0,01$) de larga duración (> 60 min) que se revierte por el AS (2 ± 3 mmHg, $n=4$) pero no por el SI (20 ± 6 mmHg, $n=4$, $p < 0,01$). Proponemos que la interacción TRH-Lp contribuye a la fuerte asociación entre obesidad e hipertensión arterial.

- 473. Canales de K⁺ sensibles al Ca²⁺ en células de músculo liso de arteria mamaria humana.** Jessica Raingo(1), Alejandro Rebolledo(1), Angela O. Grassi de Gende(1), Verónica Milesi(1).

(1)Departamento de Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Exactas, UNLP
mailto:jescaraingo@yahoo.com

Los canales de K⁺ regulan el potencial de membrana y el estado contráctil en los miocitos vasculares lisos. Nuestro objetivo fue estudiar estos canales en la arteria mamaria humana (AMH) mediante la técnica de patch-clamp. A partir de experimentos anteriores sabemos que en la configuración de célula entera se registran corrientes totales activadas por pulsos de voltaje características de canales de K⁺. En la configuración 'cell-attached' de canal único en condiciones simétricas de concentración de K⁺ se

observaron distintas conductancias al ion K⁺ cuyos valores promedio calculados a partir de curvas corriente-voltaje son de $221 \pm 0,4$ pS ($n=27$, 5 células), $179 \pm 0,4$ pS ($n=24$, 5 células), $104 \pm 2,7$ pS ($n=34$, 6 células), y $41 \pm 2,0$ pS ($n=21$, 6 células). En esta configuración la relación entre la probabilidad de apertura (Po) de los canales y el voltaje para cada tipo de canal fue de tipo exponencial de orden 1, como se esperaría para canales sensibles al voltaje. En la configuración de 'inside-out' (Ca²⁺ < 100 nM en contacto con el lado intracelular de la membrana) los canales de 221 pS y 179 pS muestran valores de Po cercanos a 0. Al aumentar el Ca²⁺ a 10-6 M la Po crece de 0.0015 a 0.1 para el canal de 221 pS ($n=2$) y de 0.0075 a 0.7 para el de 179 pS ($n=2$). El canal de 221 pS fue bloqueado por iberitoxina 100 nM, lo que permite concluir que en la AMH está presente el canal de K⁺ activado por Ca²⁺ de alta conductancia (maxi KCa) descrito en otros tipos de músculo liso vascular.

- 474. El isofluorano potencia la respuesta beta adrenérgica en el corazón aislado de conejo.** Julio C. Marini(1), Martín Donato(2), Ricardo J. Gelpi(2).

(1)Instituto de Cardiología de Corrientes 'J F Cabral' (2)Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Dpto de Patología, Fac de Medicina, UBA
mailto:mdonato@fmed.uba.ar

Los anestésicos volátiles pueden modificar la respuesta inotrópica del miocardio cuando es estimulado por catecolaminas. Sin embargo, estudios recientes mostraron cierta discrepancia según el agente empleado. El objetivo fue determinar la respuesta inotrópica del miocardio al isoproterenol, en presencia de isofluorano. Corazones aislados e isovolúmicos de conejo fueron perfundidos según la técnica modificada de Langendorff. Se realizaron 2 grupos: G1 ($n=6$) se administró 1 bolo de isoproterenol (10-8 mM) y se evaluó la función ventricular; luego de recuperarse los valores basales se realizó una nueva administración (10-7 mM). G2 ($n=5$): isofluorano (1 vol%) durante 10 minutos, y luego se repitió el protocolo de G1, al finalizar la evaluación de la función ventricular se agregó adenosina (ADO), 0.3 mg/Kg/min, seguida por una nueva estimulación beta adrenérgica (10-7 mM) (G2 + ADO). Se midió la presión desarrollada ventricular izquierda (PDVI, mmHg). X \pm ES. *: $p < 0,05$ G2 vs G1; #: $p < 0,05$ G2 vs ADO Grupos: PDVI (mmHg)

	Basal	Isop 10-8mM	Isop 10-7mM
G1	107.3 \pm 5.0	127.8 \pm 6.8	135.6 \pm 11.6
G2	106.5 \pm 3.4	164.7 \pm 9.5*	175.5 \pm 8.6*
G2 + ADO	100.4 \pm 3.3	138.8 \pm 8.7#	145.4 \pm 7.7#

El isofluorano incrementó el efecto inotrópico del isoproterenol. La presencia de adenosina durante la administración de isoproterenol abolió la potenciación del anestésico.

- 475. Efectos del Losartán sobre el remodelamiento y la función ventricular en conejos con infarto de miocardio experimental.** Germán E. González(1), Celina M. Morales(1), Manuel J.M. Rodríguez(1), Florencia V. Mangas(1), Jimena Palleiro(1), Ricardo J. Gelpi(1).

(1)Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Fac. Medicina, UBA
mailto:gegonzal@fmed.uba.ar

Los efectos del losartan (L) sobre el remodelamiento ventricular (RV) post-infarto de miocardio (IM) son controvertidos. Objetivo: Determinar si la administración temprana de L modifica el RV post-IM. Métodos: 35 conejos sometidos a la ligadura de la arteria coronaria izquierda fueron divididos en 4 grupos (G): G1 (sham; $n=9$), G2 (IM; $n=8$), G3 (sham+L; $n=9$); G4 (IM+L; $n=9$). El L (12.5 mg/kg/d) se administró diariamente desde el día de la cirugía hasta el día 35. Seguidamente los corazones fueron aislados y perfundidos según la técnica de Langendorff para realizar curvas presión-volumen (P/V). Luego fueron fijados en formol y teñidos

con Tricrómico de Masson. Se midió el tamaño de IM (TIM, %) y el área del septum (AS; mm²), mediante análisis morfométrico. Resultados (X±SEM): El TIM% fue: G2: 27.3±3 y G4: 19.5±4.1. El AS fue G1: 1.6±0.2; en G2: 1.8±0.4, en G3: 1.0±0.2 y en G4: 1.3±0.3. El L no modificó el estado inotrópico en los grupos estudiados. La relación P-V diastólica se muestran en el cuadro. *:P<0.05 vs G1; # vs G1, G2 y G3:

P(mmHg)	10	20	30	40
G1	0.4±0.1	1±0.1	1.3±0.1	1.6±0.1
G2	0.9±0.2*	1.6±0.2*	1.9±0.2*	2.2±0.2*
G3	1.0±0.2*	1.3±0.2*	1.9±0.2*	2.2±0.2*
G4	1.8±0.3#	2.4±0.3#	2.7±0.3#	3±0.3#

Conclusión: el L modificó desfavorablemente el RV, aumentando la dilatación ventricular. El hecho que el L aumento la cavidad en G3, sugiere que el IM no es el único factor implicado en la dilatación.

476. La activación de la proteína quinasa C, durante la reperfusión, atenúa la rigidez diastólica de la disfunción postisquémica. Martín Donato(1), Verónica I. D'Annunzio(1), Melina Sabán(1), Omar Scapín(2), Ricardo J. Gelpi(1).

(1)Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Dpto de Patología, Fac de Medicina, UBA (2)Fundación Grupo de Estudios Multicéntricos en Argentina (GEMA)
mailto:mdonato@fmed.uba.ar

Existe evidencia experimental acerca de la participación de la proteína quinasa C (PKC), como mediador intracelular en el preconditionamiento isquémico. Sin embargo, su participación durante la reperfusión (R) es controvertida. El objetivo fue determinar si la estimulación de la PKC, durante la reperfusión, protege al miocardio de la disfunción ventricular postisquémica. Se utilizaron corazones aislados e isovolúmicos de conejo. Grupo 1 (G1, n=14) fue sometido a 15 min de isquemia global seguida por 30 min de R. En el Grupo 2 (G2, n=5) se repitió el protocolo de G1, pero se administró un agonista selectivo de la PKC (PMA, 0.2 nM) desde el inicio de la R. Se midió la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI, mmHg), la presión diastólica final (PDFVI, mmHg) (rigidez diastólica) y el tamaño de infarto (% del área del ventrículo izquierdo). X±SEM, *:p<0.05 vs G1.

	Control	30 min R	Infarto (%)
G1 (PDVI)	102.8±2.8	57.5±2.2	2.7±0.8
(PDFVI)	9.4±0.2	39.0±2.6	
G2 (PDVI)	88.3±6.3	53.2±5.9	5.3±2.1
(PDFVI)	9.0±0.7	20.5±3.2*	

La activación de la PKC atenuó el aumento de la rigidez diastólica; sin modificar la alteración del estado contráctil. Esta protección no involucró modificaciones significativas en el tamaño de infarto.

477. Modulación de la frecuencia cardíaca (FC) por el inhibidor de la óxido nítrico sintasa, L-NAME. Ana M. Balaszczuk(1), Andrea Fellet(1), Carla Di Verniero(1), Patricia Arza(1), Noelia Vinzio(1), Vinetu Servo Kluch(2), Cristina T. Arranz(1).

(1)Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA (2)Universidad Ciencias de la Salud. Fundación Barceló
abalasz@huemul.ffyb.uba.ar

Previamente mostramos que el L-NAME, induce un aumento de la presión arterial (PA) y de la FC independiente de la inervación autonómica cardíaca. Se estudió la participación hormonal y de los receptores b-adrenérgicos en esos efectos. Se evaluó el delta(D)FC y DPA en ratas anestesiadas. Grupos: A: control (n = 14) con vagotomía bilateral y bloqueo ganglionar con Hexametonio (10mg/kg) manteniéndose la PA con una infusión iv de fenilefrina (4-6mg/kg/min); B: tiroidectomía previa e igual tratamiento que el grupo A, (n = 10); C:pretratamiento con propranolol (3 mg/kg) e igual tratamiento que el grupo A (n =7). Todos recibieron L-NAME (7,5 mg/kg, iv) 10 min después del bloqueo autonómico y las mediciones se realizaron antes y durante 30min. posteriores al bolus.El L-NAME produjo similares incrementos de la PA en los tres grupos (Media ± DS) (A= 39±14 mmHg, B=31±16 mmHg, C=47 ±12 mmHg). No se observaron diferencias en el DFC entre los grupos A (34 ± 12 lpm), C (22±12 lpm).En el grupo B el DFC (18 ±7* lpm, p<0.05) fue menor comparado con el grupo A. La administración de L-NAME en ratas con bloqueo del sistema autonómico produce un aumento de la PA independiente de la presencia de las glándulas tiroideas y propranolol. La tiroidectomía atenuó el efecto cronotrópico positivo del L-NAME, este se mantuvo luego del bloqueo b-adrenérgico. El efecto taicardizante del L-NAME estaría mediado por las hormonas tiroideas y/o una acción directa en el marcapasos.