

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ORIGINALES

CARDIOLOGÍA I

1. (3468) EFECTOS DE LAS CATECOLAMINAS EN EL ATONTAMIENTO MIOCÁRDICO. SAID, MARÍA MATILDE; VITTONI, LETICIA; MUNDIÑA-WEILENMANN, CECILIA; MATTIAZZI, ALICIA

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Cs Médicas, UNLP, Argentina.

Los mecanismos de los efectos deletéreos de la liberación de catecolaminas en la recuperación contráctil pos-isquémica del miocardio, son aún discutidos. En este trabajo se estudió en corazones perfundidos de rata, sometidos a 20min de isquemia/30min de reperfusión, si estos efectos están mediados por mecanismos dependientes o independientes de la estimulación de receptores adrenérgicos (RA). La recuperación de la velocidad máxima de desarrollo de la presión (+dP/dt) fue 53.7±8.1% respecto de los valores preisquémicos en corazones controles y aumentó significativamente a 87.1±4.1% en corazones deplecionados de catecolaminas (pretratamiento con reserpina 5mg/kg, 24Hs previas al sacrificio). El bloqueo de los RA alfa[[1]] con 1µM prazosin, disminuyó significativamente la recuperación de +dP/dt a 21.2±5.3%, mientras que el bloqueo de los RA β con 1µM propranolol no modificó la recuperación contráctil. El bloqueo de los RA β tampoco afectó el aumento o la disminución de la recuperación de +dP/dt observado por tratamiento con reserpina o prazosin respectivamente. La formación de radicales libres inducida por catecolaminas se evaluó por peroxidación de lípidos (TBARS). La cuantificación de TBARS a los 30min de reperfusión fue significativamente menor en corazones reserpinizados respecto a los no tratados (20.65±1.00 vs 34.12±4.08 nmol/g tejido, p<0.05). Los resultados indican que en la recuperación contráctil pos-isquémica del miocardio las catecolaminas ejercen un efecto beneficioso mediado por estimulación alfa[[1]] adrenérgica, y un efecto deletéreo independiente de los RA y asociado con el aumento del stress oxidativo.

2. (3543) LA HIPERCOLESTEROLEMIA ATENÚA LA DISFUNCION VENTRICULAR POSTISQUÉMICA EN EL CORAZÓN AISLADO DE CONEJO. D'ANNUNZIO, VERÓNICA; DONATO, MARTÍN; MORALES, CELINA; SABARROS, JAVIER; GELPI, RICARDO J.

Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Dpto de Patología, Facultad de Medicina, UBA

Es conocido que la hipercolesterolemia deprime el inotropismo. Sin embargo, su efecto sobre el atontamiento cardiaco es controvertido. El objetivo fue determinar el efecto de la hipercolesterolemia sobre el miocardio atontado. Corazones aislados e isovolúmicos de conejo fueron perfundidos según la técnica de Langendorff y sometidos a 15 minutos de isquemia global y 30 minutos de reperfusión (G1, n=8). En G2 (n=11) se repitió G1 pero los animales fueron expuestos a una dieta con 1% de colesterol durante 4 semanas. En G3 (n=5) se repitió G2, pero a los corazones se les administró isoproterenol (Iso), antes de la isquemia, con el objeto de igualar el estado contráctil y se consideró este momento como control. Se midió la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI, %), la presión de fin de diástole

(rigidez miocárdica) (PDFVI, %) y el colesterol total (mg/dl). X±ESM; *: p<0.05 vs G1. Resultados: En G3 la PDVI, previo a la infusión de Iso, fue de un 83.9±5.4% del valor alcanzado con la administración de Iso (control).

	Control	30 minutos	Colesterol total
PDVI (G1)	100±0	67.3±3.6	59.3±6.9
PDFVI (G1)	100±0	386.1±43.6	
PDVI (G2)	100±0	90.8±3.0*	340.2±128.3*
PDFVI (G2)	100±0	161.4±2.5*	
PDVI (G3)	100±0	58.6±11.6	
PDFVI (G3)	100±0	388.1±80.2	

La dieta enriquecida con colesterol atenúa la disfunción postisquémica sistólica y diastólica. Este efecto protector es abolido al igualar el estado contráctil previo a la isquemia, sugiriendo que el menor inotropismo del G3 sería la causa de la protección encontrada.

3. (3582) REDUCCIÓN DEL TAMAÑO DE INFARTO POR UN NUEVO MECANISMO FISIOLÓGICO DE PROTECCION MIOCÁRDICA: POSTCONDICIONAMIENTO ISQUEMICO. DONATO, MARTÍN; D'ANNUNZIO, VERONICA; SABÁN, MELINA; FLOR, LAURA; GELPI, RICARDO J.

Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires .

Breves episodios de isquemia y reperfusión realizados antes de una isquemia prolongada reducen el tamaño de infarto (Precondicionamiento isquémico, Pre-con). El objetivo fue determinar si breves episodios de isquemia y reperfusión realizados inmediatamente después de un episodio de isquemia prolongada reducen el tamaño de infarto. Corazones aislados e isovolúmicos de conejo fueron perfundidos según la técnica de Langendorff y sometidos a 30 min de isquemia global seguido de 30 min de reperfusión (G1, n=8). En el grupo 2 (G2, n=8) se repitió G1 pero se realizó un protocolo de Pre-con (5 min de isquemia seguidos de 5 min de reperfusión, previos a 30 min de isquemia). En el grupo 3 (G3, n=5), se repitió G1 pero inmediatamente después de la isquemia se realizaron dos episodios de isquemia y reperfusión de 30 seg cada uno (Poscondicionamiento isquémico, Post-con). Se evaluó la presión desarrollada (PDVI, mmHg) y la presión diastólica final (rigidez miocárdica) (PDFVI, mmHg) y el tamaño de infarto utilizando TTC. X±ESM; *: p<0.05 vs G1

	Control	30 min R	Infarto %
PDVI (G1)	98.99±3.35	39.99±3.54	14.10±0.72
PDFVI (G1)	8.55±0.30	48.25±4.50	
PDVI (G2)	98.86±3.61	36.87±2.97	5.09±1.75*
PDFVI (G2)	8.37±0.67	44.89±4.33	
PDVI (G3)	99.18±8.02	35.06±6.12	7.81±2.44*
PDFVI (G3)	9.41±0.39	74.96±16.66	

El Post-con reduce el tamaño de infarto en la misma magnitud que el Pre-con, sin atenuar la disfunción postisquémica. Este nuevo mecanismo fisiológico de protección deberá ser estudiado en detalle para dilucidar su mecanismo intrínseco.

4. (3717) DISFUNCIÓN PARASIMPÁTICA CARDÍACA RELACIONADA CON DEPRESIÓN EN ADULTOS MAYORES CON SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS. LADRÓN DE GUEVARA, M. SOLEDAD; NICOLA SIRI, LEONARDO; FAHRER, RODOLFO; SAMPÓ, EDUARDO; ORTIZ, ENRIQUE; CARDINALI, DANIEL; GUINJOAN, SALVADOR M.

Hospital de Clínicas - Dto. de Salud Mental Dto. de Salud Mental y U. Coronaria, Hospital de Clínicas, Dto. de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA

Objetivo: Determinar si la depresión esta asociada con alteraciones de la actividad autonómica cardíaca en adultos mayores con un síndrome coronario agudo(SCA) reciente. Método: Estudio clínico transversal sobre la asociación entre un episodio depresivo mayor o síntomas depresivos aislados(escala de Hamilton de 21 ítems) y anomalías de la variabilidad de la frecuencia cardíaca en 56 adultos (31 mujeres, 55%) mayores de 60 años con infarto de miocardio o angina inestable recientes (24-72 hs de evolución). Resultados: Las medidas espectrales y no espectrales de arritmia sinusal respiratoria, indicativas de la actividad parasimpática sobre el corazón fueron menores (variabilidad de alta frecuencia [log ms(2)] 2.12 ± 0.4 vs 2.52 ± 0.5 $p=0.024$; pNN50 [%] 1 ± 2 vs. 9 ± 15 $p=0.006$; y rMSSNN [ms] 16 ± 6 vs. 28 ± 22 , $p=0.009$). También la variabilidad cardíaca de alta frecuencia mostró una correlación inversa con la severidad de la sintomatología depresiva. En una muestra de adultos mayores con SCA, la depresión estuvo asociada a un control parasimpático anómalo del corazón. Queda por determinarse si este perfil de actividad autonómica cardíaca explica en parte el empeoramiento pronóstico coronario inducido por la depresión.

5. (3783) EL EMPEORAMIENTO DE LOS SÍNTOMAS DEPRESIVOS 6 MESES DESPUÉS DE UN EVENTO CORONARIO AGUDO EN ADULTOS MAYORES ESTÁ ASOCIADO CON UN DETERIORO DEL CONTROL AUTONÓMICO CARDÍACO. LADRÓN DE GUEVARA, M. SOLEDAD; SAMPÓ, EDUARDO; PÉREZ DE LA HOZ, RICARDO; FAHRER, RODOLFO; NICOLA SIRI, LEONARDO; ORTIZ, ENRIQUE; CARDINALI, DANIEL; GUINJOAN, SALVADOR M.

Dto. de Salud Mental, Hospital de Clínicas, UBA Dto de Salud Mental y U. Coronaria, Hospital de Clínicas, y Dto de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA

Fundamentos: La depresión aumenta la mortalidad de pacientes coronarios. Objetivo: Establecer la relación entre progresión de síntomas depresivos y cambios en el control autonómico del corazón. Métodos: En una muestra de 38 adultos de 60 años o más con infarto de miocardio o angina inestable, estudiamos la presencia de depresión (episodio depresivo mayor y puntaje en la escala de Hamilton de depresión de 21 ítems) y la variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC) de 550 latidos normales poco después de la admisión a la unidad coronaria. Treinta pacientes sobrevivieron a los 6 meses y fueron estudiados también en ese momento. Se estudiaron medidas espectrales y no espectrales de la VFC. Las primeras incluyeron la densidad espectral en los rangos de alta frecuencia (HF, 0.15 a 0.55 Hz, indicativo de actividad parasimpática) y de baja frecuencia (LF, 0.03 a 0.15 Hz). Las medidas no espectrales incluyeron al desvío estándar de los latidos normales (SDNN) y dos medidas de actividad vagal: porcentaje de latidos adyacentes que difieren en >50 mseg (PNN50) y la raíz cuadrada del promedio de diferencias latido a latido elevadas al cuadrado (RMSNN). Resultados: Los pacientes que fallecieron dentro de los 6 meses de evolución ($n=8$) tuvieron un puntaje Hamilton de depresión mayor al de los sobrevivientes (13.9 ± 6.5 vs. 18.4 ± 5.6 , $p=0.039$), y era más probable que tuvieran un episodio depresivo mayor a la admisión al hospital (71 vs. 27%, $p=0.027$). Un aumento del puntaje Hamilton a los 6 meses correlacionó con una disminución de la VFC de tipo HF ($r=-0.49$, $p=0.007$), LF ($r=-0.46$, $p=0.014$) y total ($r=-0.48$, $p=0.014$). El aumento de síntomas depresivos 6 meses después de un evento coronario se asocia a deterioro global del control autonómico

cardíaco. Este cambio podría relacionarse con el empeoramiento pronóstico inducido por depresión.

ENDOCRINOLOGIA Y REPRODUCCION I

6. (3231) EXPRESIÓN DE IGF-1, IGF-2, RECEPTOR DE IGF TIPO 1 (IGF-R1), TGF- β 1 Y AROMATASA (ARO) EN TUMORES ADRENOCORTICALES PEDIÁTRICOS (TAP): IMPLICANCIAS EN EL PERFIL HORMONAL TUMORAL. BAQUEDANO, MS; SARACO, N; BERENSHSTEIN, E; GUERCIO, G; DÁVILA, MTG DE; RIVAROLA, MA; BELGOROSKY, A.

Laboratorio de Investigación, y Servicios Endocrinología y Anatomía Patológica. Hospital de Pediatría Garrahan. Buenos Aires. Argentina

La disminución de la expresión de 3β -HSD en la zona reticularis (ZR) contribuiría con el aumento de andrógenos adrenales en la adrenarca. Los tumores adrenales virilizantes se asocian a baja actividad de 3β -HSD. El objetivo fue evaluar la expresión de ARNm de IGFs, IGF-R1, TGF- β 1 y ARO por RT-PCR semicuantitativa en 7 TAP en comparación con tejido humano normal prepuberal y puberal, TAH. Se estudiaron 30 TAH (GRUPO CONTROL, GC); 6 TAP predominantemente virilizantes (TAV) entre 1,3 y 4,5 a y 1 tumor de Cushing de 15,9 a. En función de la edad de inicio de la adrenarca, los resultados se analizaron en 2 G: G1, 3m a 6a (GC1, $n=19$; GT1, $n=6$) y G2 > 6a (GC2, $n=11$; GT2, $n=1$). La expresión de ARNm de ARO y IGF-R1 fue significativamente mayor, $p<0.05$ en GT1 (2.18 ± 0.8 ; 4 ± 1.7 UA) que en GC1 (1.17 ± 0.6 ; 1.89 ± 0.9) y similar a GC2 (1.79 ± 0.7 ; 3.7 ± 1.4). La abundancia de ARNm de IGF-1 en GT1 (0.77 ± 0.3) fue significativamente menor que en GC1 (1.64 ± 0.9) y similar a GC2 (0.88 ± 0.3). No hubo diferencias en ARNm de IGF-2 entre GT1 (1.19 ± 0.3) y GC (GC1, 1.43 ± 0.4 ; GC2, 1.3 ± 0.2). La expresión de TGF- β 1 en GT1 (0.54 ± 0.2) fue significativamente menor que en GC2 (0.88 ± 0.2). Por inmunohistoquímica (IHQ) se vio muy débil expresión de TGF- β 1 en ZR de GC2. En tumor de Cushing, el ARNm de ARO fue el más bajo y de TGF- β 1 el más alto comparado con TAV. Esto concuerda con estudios que muestran que estradiol inhibe y TGF- β 1 aumenta la expresión de 3β -HSD en células adrenales humanas en cultivo. Dado que se observó una correlación positiva y significativa entre peso tumoral y ARNm de IGF-R1; $r=0.75$, $p<0.05$ y por IHQ (SAIC 2002) una muy débil expresión de IGF-R1 e IGF-1 en ZR de GC2 sugerimos que el sistema IGFs-IGF-R1 estaría involucrado en la proliferación de la célula tumoral. Finalmente, el perfil de secreción hormonal tumoral estaría regulado por la actividad de TGF- β 1 y la producción local de estradiol.

7. (3259) INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS Y ESTÍMULO DE LA SECRECIÓN DE TESTOSTERONA POR TGF β 1 EN CÉLULAS TESTICULARES HUMANAS PREPÚBERES EN CULTIVO. BERENSHSTEIN, ESPERANZA; SCIARA, M; SARACO, N; RIVAROLA, MA; BELGOROSKY, A

Laboratorio de Investigación, Hospital de Pediatría J.P.Garrahan, Buenos Aires.

Se ha observado una expresión diferencial de TGF β 1 y de sus receptores durante el desarrollo del testículo. Se ha sugerido que el TGF β 1 sería responsable de prevenir una espermatogénesis prematura. La acción de TGF β 1 sobre la esteroidogénesis es controvertida aunque se ha postulado un efecto estimulador sobre la misma. En testículo humano la información sobre la expresión y la función del TGF β 1 resulta escasa. Previamente, hemos descrito que el TGF β 1 se inmunolocaliza en células intersticiales de testículo humano prepúber (SAIC 2002). El objetivo fue estudiar el rol de TGF β 1 sobre la regulación de la apoptosis y de la diferenciación de células de Leydig humanas prepúberes. Se estudiaron cultivos primarios de testículos provenientes de autopsias de pacientes entre 4 días y 32 meses. La suspensión celu-

lar mixta de células testiculares se cultiva dos días en suero fetal bovino 10(SFB) y cuatro días más en condiciones basales (sin SFB) o en presencia de TGF β 1 (8x10⁻¹¹ M), con cambios cada 48 hs. Al sexto día se determinó la testosterona (T) en el medio condicionado por RIA y se detectó la apoptosis en la monocapa fijada por el método de TUNEL, definiéndose el índice apoptótico (IA) como el número de células positivas por cada cien totales. El tratamiento crónico con TGF β 1 disminuyó la apoptosis en cinco de seis cultivos (8.49 \pm 4.22% vs 2.16 \pm 2.10% p=0.021, x \pm SD, n=5, basal vs TGF β 1, Paired-t-test). La T se incrementó bajo TGF β 1 respecto del basal en cinco cultivos (432 \pm 283 p=0.047, ANOVA). La disminución del índice apoptótico junto con el aumento de la secreción de T sugeriría que la estimulación con TGF β 1 puede favorecer la diferenciación de células con capacidad esteroidogénica. Estos resultados sugieren un rol del TGF β 1 como factor paracrino en testículo humano prepuber.

8. (3260) SISTEMA IGFS-IGFBPS Y SENSIBILIDAD A LA INSULINA (SI) EN PREPUBERTAD (PP): POSIBLE IMPLICANCIA EN LA ADRENARCA HUMANA (ADR). GUERCIO, GABRIELA; CHALER, EDUARDO; MACEIRAS, MERCEDES; RIVAROLA, MARCO A.; BELGOROSKY, ALICIA

Servicio de Endocrinología, Hospital de Pediatría Garrahan

Los mecanismos involucrados en el inicio de la ADR permanecen sin conocerse con precisión. Recientemente hemos descrito que el eje GH/IGF-I y la SI estarían involucrados en el mecanismo de la ADR solo en niñas, sugiriendo un dimorfismo sexual en la regulación de la secreción de andrógenos adrenales (AA) al momento de inicio de la ADR (Guercio y col. JCEM 87: 1162-69, 2002; 88:1389-93, 2003). Nuestro objetivo fue analizar el rol del sistema IGFS-IGFBPs y la SI en la regulación de la secreción de AA en varones (V) y mujeres (M) normales Pp. Se evaluaron 44 sujetos Pp (Gr1) 23V y 22M, divididos de acuerdo a la mediana de la edad cronológica en Pp tempranos (Gr1A) y Pp tardíos (Gr1B). Se analizaron los niveles séricos de dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), IGF-1 e IGF-II así como las fracciones séricas de IGFS-unido(u)-IGFBPs. La relación Glucemia/Insulina (G/I) en ayunas se estimó como parámetro de SI. Se utilizó una ecuación derivada de la ley de acción de masas para estimar las fracciones séricas de los IGFS. Entre sexos se halló que: en MGr1B G/I fue menor (p=0.01) que en VGr1B (19.3 \pm 7.24 vs 38.2 \pm 20.9); IGF-1t en M fue mayor (p<0,05) que en V en GR1(122.5 \pm 66.8 vs. 85.2 \pm 42.7) y 1B; IGF-I-u-IGFBP3 (ng/ml) en M fue mayor (p<0.05) que en V en Gr1 (98.9 \pm 54 vs. 67.5 \pm 34.8) y 1B (127 \pm 45 vs. 83.2 \pm 34.7). El análisis múltiple de Pearson mostró una correlación negativa significativa entre DHEAS con G/I y una correlación positiva sig. con IGF-1t y IGF-I-u-IGFBP3 solo en M, mientras que en V se halló una correlación positiva sig. entre DHEAS con IGFBP-3 e IGF-II-u-IGFBP-3. Estos resultados refuerzan la existencia de un dimorfismo sexual en el mecanismo de la ADR. Estudios futuros serían necesarios para definir el rol del IGF-II-u-IGFBP-3 en la ADR.

9. (3376) EFECTO DE LA LEPTINA SOBRE LA REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DEL EJE GONADAL EN RATAS MACHO ADULTAS. PONZO, OSVALDO J.; REYNOSO, ROXANA; RONDINA, DORA; SZWARCFARB, BERTA; CARBONE, SILVIA; SCACCHI, PABLO; MOGUILLEVSKY, JAIME A.

Dep. de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA.

En trabajos anteriores, hemos demostrado el efecto estimulador de la leptina (LEP) sobre el eje gonadal, en ratas macho pre y peripuberes. Objetivo: evaluar el efecto de la LEP sobre la regulación neuroendocrina gonadal en ratas macho adultas. Se usaron ratas Wistar macho adultas de 75 días de edad (n= 8-10 por grupo). La LEP fue administrada ip en dosis de 30, 100 y 300 μ g/kg y los animales sacrificados a los 60 min. Se determinó la concentración adenohipofisaria y plasmática de LH.

Por otra parte, se incubaron hipotálamos anteromediobasales (APO-AMBH) con LEP a la dosis de 10(-9) M, 10(-10) M, 10(-12) M para la determinación de GnRH y de 10(-10) M para aminoácidos excitatorios (glutamato) e inhibitorios (GABA). Resultados: las tres dosis de LEP reducen los niveles plasmáticos e hipofisarios de LH. Plasma: Control: 52.45 \pm 10.1, LEP 30 μ g/kg: 11.8 \pm 3.2, LEP 100 μ g/kg: 22.71 \pm 5.1; LEP 300 μ g/kg: 14.33 \pm 2.9 ng/ml (p <0.01 vs control). Tejido adenohipofisario: Control: 322 \pm 32, LEP 30 μ g/kg: 163 \pm 19.7, LEP 100 μ g/kg: 157 \pm 21.7, LEP 300 μ g/kg: 172 \pm 7 ng/mg tejido (p <0.01 vs control). Todas las dosis utilizadas "in vitro" inhiben la liberación de GnRH por APO-AMBH (p <0.01), Control: Basal: 4.55 \pm 0.8, Medio: 4.06 \pm 0.53; LEP: Basal: 7.36 \pm 1.14, LEP 10(-12): 3.2 \pm 0.8; Basal: 5.35 \pm 0.92, LEP 10(-10): 3.11 \pm 0.08; Basal: 6.0 \pm 1, LEP 10(-9): 3.18 \pm 0.4 pg/mg tejido. La LEP en la dosis de 10(-10) M inhibe la liberación desde APO-AMBH de glutamato (p<0.01): Control: Basal: 1325 \pm 118, Medio: 981 \pm 113.6, LEP: Basal: 886.1 \pm 177.9, LEP 10(-10): 432.2 \pm 29 pM/100 μ l medio, y estimula la de GABA (p<0.01): Control: Basal: 3399 \pm 319.5, Medio: 3502.3 \pm 291.6; LEP: Basal: 4963.1 \pm 291.4, LEP 10(-10): 6538.1 \pm 364.8 (pM/100 μ l medio). Conclusión: A diferencia de lo observado en ratas macho pre y peripuberes, la LEP inhibe el eje gonadal en ratas macho adultas. Este efecto se produce sobre los mecanismos de regulación hipotalámica del eje gonadal.

10. (3401) ESTUDIOS IN VITRO DE LA FUNCIÓN CORTICOADRENAL, EN ANIMALES NORMO E HIPERLEPTINÉMICOS, DURANTE CONDICIONES DE BALANCE ENERGÉTICO NEGATIVO (BEN). PERELLO, MARIO; MORENO, GRISELDA; SPINEDI, EDUARDO.

Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE (CONICET-CICPBA) La Plata

La hormona adipocitaria leptina modula la función corticoadrenal inhibiendo el efecto estimulador de ACTH. Objetivo: determinar in vitro cómo se modifica la actividad adrenal durante BEN en células adrenales de ratas normo (control, CTR) e hiperleptinémicas (generados por lesión hipotalámica con monosodio L-glutamato, MSG). Ratas CTR y MSG fueron alimentadas ad libitum (AL), ayunadas por 72 hs (AY) o sujetas a restricción alimentaria crónica (RAC). Los animales se sacrificaron por decapitación y en el plasma se determinó ACTH, glucocorticoide (GC) y leptina. Las adrenales se dispersaron y se estudió in vitro la respuesta corticoadrenal a ACTH (0,01-1 ng/ml) y leptina (1-100 nM). Resultados: El BEN incrementó los GC circulantes, no modificó ACTH y disminuyó la leptinemia (CTR: AL=5,65 \pm 0,70; AY=0,86 \pm 0,01; RAC=2,60 \pm 0,16 y MSG: AL=18,33 \pm 1,07; AY=0,72 \pm 0,04; RAC= 3,18 \pm 0,19 ng/ml). Las células adrenales provenientes de CTR-AY y CTR-RAC desarrollaron un incremento en la sensibilidad a ACTH respecto a las células de CTR-AL. En las células CTR, la sensibilidad a leptina no se modificó por el BEN. Las células adrenales de MSG-AL fueron refractarias al efecto inhibitorio de leptina; MSG-AY no modificó la respuesta in vitro a ACTH y leptina respecto al MSG-AL, aunque MSG-RAC incrementó la sensibilidad a ambos compuestos. Conclusión: El aumento de GC circulante inducido por el BEN podría deberse a un aumento en la sensibilidad adrenal a ACTH como consecuencia de la disminución en la leptinemia. Esto se observa también en las células adrenales del grupo MSG, ya que, mientras son insensibles a leptina (MSG-AY), no incrementan la respuesta in vitro a ACTH respecto a los MSG-AL y, cuando la sensibilidad a leptina se instala (MSG-RAC), la respuesta a ACTH aumenta. (PICT 5-5191/99)

11. (3421) REGULACIÓN DE LA FOLICULOGÉNESIS POR ANÁLOGOS DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GNRH) EN LA RATA. PARBORELL, FERNANDA; IRUSTA, GRISELDA; GONZALEZ, OLGA; VITALE, ALEJANDRA; TESONE, MARTA

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Objetivo: Evaluar el efecto de análogos de GnRH (agonista: acetato de leuprolide, LA; y antagonista: Antide, Ant), sobre el desarrollo folicular. Métodos: Ratas hembra prepúberes superovuladas con PMSG (grupo Control) se trataron con LA (1µg/rata/día durante 48 hs) (grupo LA) y/o Ant (10 ug/rata/día durante 48 hs) (Grupo LA+Ant; Grupo Ant, respectivamente). Resultados: Se realizó un recuento de folículos en cortes histológicos. El LA aumentó el número de folículos preantrales (FP) y atrésicos (FAT): (FP=C: 3,41±0,35, LA: 8,08±0,97; FAT=C: 1±0,2; LA: 4,7±0,35; p<0,05). En cambio, el número de folículos antrales (Fant.T) y folículos preovulatorios (FPO) disminuyó (Fant.T=C: 17,25±1,29, LA 8,16±1,43; FPO=C: 6,58±0,63, LA: 2,91±0,39, p<0,05). En el grupo LA+Ant aumentó el número de Fant.T y FPO (Fant.T=LA+Ant: 20,02±3,28, LA 8,16±1,43; FPO=LA+Ant: 17,75±2,36, LA: 2,91±0,39, p<0,05) y disminuyó el número de FP y FAT comparado al grupo LA solo (FP=LA+Ant: 4,83±0,53, LA 8,08±0,97; FAT=LA+Ant: 0,66±0,2, LA: 2,91±0,39, p<0,05). LA causó un aumento en el % de células apoptóticas medidas en cortes de ovario en FP, Fant.T y FPO. En cambio, el tratamiento con ambos análogos disminuyó el % de células apoptóticas en todos los estadios estudiados comparado al grupo LA (FP=LA+Ant: 5,54±0,66, LA 44,8±3,1; Fant.T=LA+Ant: 6,72±1,19, LA: 31±2,5; FPO=LA+Ant: 7,09±1,3, LA 31±3,3, p<0,05). El LA aumentó la fragmentación apoptótica de ADN luego de cultivar folículos preovulatorios durante 24 hs (Control: 659±25; LA: 1706±94, p<0,05) y en el grupo LA+Ant, el ADN apoptótico disminuyó (LA: 1706±94, Ant+LA: 841±241, p<0,05). Estos resultados corroboran los datos obtenidos en los estudios morfológicos. Conclusión: se sugiere un acción directa de LA sobre el ovario, interfiriendo en el desarrollo folicular estimulado por las gonadotrofinas. El Ant bloquearía la acción del agonista, confirmando que el efecto de LA sobre el ovario sería a través de los receptores de GnRH presentes en este órgano.

12. (3586) PARTICIPACIÓN DEL CUERPO LÚTEO EN EL RETRASO DEL PARTO INDUCIDO POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF). RIBEIRO, MARÍA LAURA; MEISS, ROBERTO; ESTEVEZ, ALEJANDRA; MOTTA, ALICIA; FARINA, MARIANA; FRANCHI, ANA

CEFYBO, CONICET. Academia Nacional de Medicina.

Se ha informado que el EGF participa en el inicio del parto. Hemos observado que la administración intra-uterina (i/u) de 500 ng de EGF en el día 21 de preñez retrasa 18±0.6 horas el inicio del parto. Durante toda la preñez en la rata la P, secretada por los cuerpos lúteos (CL), es la responsable de mantener la quiescencia uterina. Se han identificado dos tipos de receptores para la P (PR) en el miometrio: PR-A y PR-B. Durante la gestación, la P estimula la expresión de los PR-A y disminuye la de los PR-B. Hacia el final de la preñez, el CL involucrea (luteólisis) debido a la acción de la PGF2alfa uterina. Esto provoca una disminución en el nivel sérico de P con la consecuente caída en la expresión de los PR-A y el aumento en la de los PR-B, facilitando así el comienzo del parto. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el mecanismo por el cual el EGF retrasa el inicio del parto. Hembras Wistar recibieron 500 ng de EGF i/u en el día 21 de gestación y se sacrificaron a las 4, 8, 12 y 24 horas luego del tratamiento. Hembras control recibieron el mismo volumen de solución salina. Se extrajeron suero, útero y ovarios. El efecto del EGF fue máximo a las 12 horas luego del tratamiento: redujo la síntesis de PGF2alfa uterina (33±10 vs 70±7 pg/mg prot) y aumentó el nivel de P sérica (31±3 vs 18±0.9 pg/ml suero, RIA). La expresión de los PR-A y de los PR-B fue similar a la de las hembras en el día 21 (Western blot). El análisis de los ovarios por tinción con hematoxilina y eosina demostró que el EGF es capaz de revertir el proceso luteolítico. En base a estos resultados, proponemos que el retraso del EGF sobre el inicio del parto estaría mediado por un mecanismo que prolonga la vida de los CL manteniendo la secreción de P y su efecto positivo sobre la quiescencia uterina.

INMUNOLOGIA I

13. (3295) LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 FAVORECE LA DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS B A CÉLULAS PLASMÁTICAS Y EL CONTROL DE PARASITEMIA EN LA INFECCIÓN CON TRYPANOSOMA CRUZI. ACOSTA RODRÍGUEZ, EVA V; MONTES, CAROLINA L; MOTRÁN, CLAUDIA C; ZÚÑIGA, ELINA I; LIU, FUTONG; RABINOVICH, GABRIEL A; GRUPPI, ADRIANA

Inmunología, Fac Cs Qcas, UNC Departament Dermatology, University of California, USA. Inmunogenética, Hospital de Clínicas, UBA

Entender los mecanismos de diferenciación de linfocitos (Li) es de vital importancia para la regulación inmune. Previamente demostramos que Galectina (Gal)-3 es una intermediaria clave para la sobrevida y diferenciación de LiB inducida in vitro por IL-4. Para evaluar el papel que juega Gal-3 en el desarrollo de una respuesta humoral in vivo utilizamos como estrategia inhibir su expresión durante la infección experimental aguda con T. cruzi. Para ello, ratones Balb/c infectados con T. cruzi fueron inyectados iv con oligonucleótidos control (C) o antisentido para Gal-3 (As) o con PBS, en los días 8, 9, 10 y 11 y sacrificados en el día 15 postinfección. Por inmunoblot se observó que el tratamiento redujo en un 50% la expresión de Gal-3 sólo en el grupo As. Este grupo presentó un marcado incremento en el porcentaje de células plasmáticas (CP) Syndecan-1 de médula ósea, evaluadas por citometría de flujo, comparado con los grupos tratados con C o PBS (16.7vs 6.9y 6.0. Por RT-PCR detectamos, en los LiB de bazo de ratones del grupo As, un aumento en el nivel del mRNA de Blimp-1 el cual podría ser responsable del incremento de CP. Consecuentemente observamos un aumento en la concentración de IgM e IgG séricas en el grupo As (190±10 ng/ml y 450±35 ng/ml) en comparación con los grupos C (110±15 ng/ml y 210±5 ng/ml) o PBS (102±7 ng/ml y 212±6 ng/ml). Finalmente, el grupo tratado con el As presentó una disminución significativa en los niveles de parasitemia (p<0.05). Nuestros resultados indican que Gal-3 participa en la diferenciación de LiB in vivo, ya que su inhibición induce un incremento en la expresión de Blimp-1 favoreciendo la diferenciación a CP. Esto se refleja en un aumento en el número de CP, los niveles de Acs y el "clearance" parasitario.

14. (3564) LA CALIDAD DE LA RESPUESTA CELULAR T ESPECÍFICA PARA EL T. CRUZI SE RELACIONA CON EL GRADO DE COMPROMISO CARDIACO EN PACIENTES CHAGASICOS CRÓNICOS. LAUCELLA, SUSANA¹; POSTAN, MIRIAM¹; ALBAREDA¹, CECILIA; PETRIGH, ROMINA¹; VIOTTI, RODOLFO²; LOCOCO, BRUNO²; RUIZ VERA, BASILIO²; TARLETON, RICK³

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatale Chabén"¹ Hospital Interzonal Eva Perón² San Martín, Department of Cellular Biology University of Georgia USA³

El sistema inmune controla la infección por Trypanosoma cruzi a través de las respuesta humoral y celular específicas. El objetivo de este trabajo es evaluar la respuesta celular T específica para T. cruzi y su relación con la severidad del compromiso cardiaco de pacientes chagásicos crónicos. Se obtuvieron células mononucleares periféricas (PBMC) de 58 pacientes chagásicos crónicos, agrupados según la clasificación de Kuschnir, y 12 controles no infectados las que fueron estimuladas con un lisado proteico de amastigotes de T. cruzi durante 16 hs, determinándose luego la frecuencia de linfocitos T productores de IFN-gamma mediante ELISPOT y tinción intracelular para citoquinas por citometría de flujo. El porcentaje de pacientes que respondieron por ELISPOT fue significativamente mayor en los grupos G0 (16/23,

Fisher exact test $p=0.001$) y G1 (6/10; $p=0.02$) que en el grupo con sintomatología mas severa G3 (2/14), no encontrándose diferencias en el grupo G2. La tinción intracelular para IFN-gamma realizados con PBMC de 20 pacientes y 5 controles no infectados, mostró respuesta positiva en 5/5, 4/5, 1/3 y 2/7 pacientes G0, G1, G2 y G3, respectivamente. Ambos compartimentos celulares T CD4+ y T CD8+, fueron estimulados por el lisado en 9/12 respondedores, mientras que 2 pacientes mostraron respuesta positiva en el compartimento T CD4 y uno en el T CD8 solamente. No se detectó respuesta específica para el T. cruzi en ninguno de los controles. Estos resultados demuestran que la frecuencia de linfocitos T periféricos específicos para el T. cruzi se relaciona con la condición clínica de los pacientes chagásicos crónicos, reforzando la hipótesis de que la calidad de la respuesta inmune al parásito determinaría la evolución de la enfermedad de Chagas crónica.

15. (3580) RESPUESTA CELULAR T CD8 TOTAL Y ESPECÍFICA CONTRA ANTÍGENOS DE T. CRUZI PRESENTADOS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS CON TRYPANOSOMA CRUZI EN PACIENTES CHAGÁSICOS CRÓNICOS. ALBAREDA, CECILIA¹; TARLETON, RICK²; ARMENTI, ALEJANDRO³; ALVAREZ, MARIELA³; BERTOCCHI, GRACIELA³; TORRES, SUSANA³; LAUCELLA, SUSANA¹; POSTAN, MIRIAM¹

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén" Buenos Aires. Department of Cellular Biology University of Georgia USA². Hospital Interzonal Eva Perón San Martín³

La dinámica de la respuesta celular T efectora y de memoria en la enfermedad de Chagas crónica es desconocida. El objetivo de este trabajo es caracterizar fenotípica y funcionalmente las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ "naïve", memoria y efectores en pacientes chagásicos crónicos. Se determinó, por citometría de flujo, la expresión de CD45RA, CD27, CD28, Bcl-2, perforina y Ki-67 en linfocitos T CD8+ periféricos, y la frecuencia de células productoras de IFN-gamma estimuladas in vitro con células dendríticas autólogas infectadas con T. cruzi. El porcentaje de linfocitos T CD8+ "naïve" (CD45RA+CD27+CD28+) fue significativamente menor en los pacientes chagásicos (media T CD8+ "naïve" + ds= 18,1+13,3, n=42) comparado con los controles (42,8+16,3 n=16; $p<0.0005$), mientras que el porcentaje de células efectoras (CD45RA+CD27-CD28-) fue significativamente mayor en los pacientes (media T CD8+ efector + ds= 45,7+20,46) que en los controles (25,2+18,01; $p<0.005$). También se observaron altos niveles de expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl2 (media T CD8+Bcl2+ + ds=93,71+4,7%) y bajos niveles de Ki-67 (media T CD8+Ki-67+ ds=2,04+1,08%). El 94% de los pacientes (17/18) desarrollaron una respuesta positiva T CD8+ de memoria específica para antígenos del T. cruzi presentados por células dendríticas in vitro, independientemente del estadio clínico. No se detectó respuesta específica en el grupo control. El análisis del fenotipo de los linfocitos T CD8+ de memoria productores de IFN-gamma+ mostró la co-expresión de los marcadores CD27 y CD28, indicando el estadio de diferenciación temprana de estas células. Estos resultados demuestran una mayor activación inmunológica de la población T CD8+ total y específica para T. cruzi en pacientes chagásicos crónicos.

16. (3662) EXPRESIÓN DE LAS FOSFATASAS SHP Y SHIP EN CÉLULAS B DE LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA (LLC-B). GAMBERALE, ROMINA; FERNANDEZ CALOTTI, PAULA; SANJURJO, JULIETA; GRASSI BASINO, ALEJANDRA; SANCHEZ AVALOS, JULIO; GEFFNER, JORGE; HIVROZ, CLAIRE; GIORDANO, MIRTA

IIHema, Academia Nacional de Medicina. Hospital de Clínicas, UBA. Instituto Curie, París, Francia

La LLC-B se caracteriza por la progresiva acumulación de linfocitos B CD5+. Está descrito que las células leucémicas presentan importantes dificultades para transducir señales de acti-

vación a través de diversas moléculas tales como el receptor para el antígeno, CD40 y el Rfc gamma IIA. Las fosfatasa SHP y SHIP juegan un rol importante en la transducción de señales inhibitorias en células linfoides y mieloides. Es por eso que nos interesó estudiar el nivel de expresión de dichas moléculas en las células LLC-B. Para ello, trabajamos con células B normales y leucémicas purificadas mediante anticuerpos específicos y perlas magnéticas y la expresión de SHP y SHIP se evaluó por Western Blot. Los resultados obtenidos con 7 pacientes muestran una mayor expresión de SHP en las células LLC-B en comparación a las B normales ($p<0.05$). Para el caso de SHIP, 4 de 7 pacientes expresan mayores niveles que las células B normales ($p<0.05$). Recientemente se ha reportado que la expresión de la proteína ZAP-70 en LLC-B está asociada con mal pronóstico y una incrementada capacidad para responder a través del receptor para el antígeno. Para los pacientes analizados, no hemos encontrado asociación entre el nivel de expresión de SHIP y ZAP-70. En conclusión nuestros resultados muestran una mayor expresión de SHP y SHIP en las células LLC-B en comparación a linfocitos B normales. Dado que estas moléculas juegan un papel clave en la transducción de señales inhibitorias, la regulación de su expresión y activación podría influenciar la fisiología de la célula leucémica.

17. (3823) MÚLTIPLES SEÑALES INTRACELULARES DETERMINAN LA INDUCCIÓN DE LA REPLICACIÓN DE T. CRUZI EN MACRÓFAGOS ESTIMULADOS CON CRUZIPAINA. STEMPIN, CINTHIA CAROLINA; CERBAN, FABIO

Inmunología - Dpto. Bioquímica Clínica - Fac. Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba

Cruzipaina (Cz) induce la activación alternativa de macrófagos (Mo), favorece el crecimiento intracelular de T. cruzi e induce arginasa (ARG) por señales intracelulares mediadas por Proteína Kinasa A (PKA) y p38 MAPK. En este trabajo se estudió si las señales intracelulares que regulan ARG también pueden regular el crecimiento del parásito en Mo. A tal fin, Cel J774 fueron tratadas 6 h con diferentes inhibidores de PKA, PKC, tirosin kinasas (TK), p38 y p44/p42 MAPK (KT5720, Calphostin C, Genistein, SB203580, PD98059, respectivamente) previo al estímulo de 18 h con Cz. A estas Cel se las infectó con tripomastigotes (Tp) (4Tp/Cel) durante 24 h. En las Cel tratadas con Cz, a diferencia de las Cel no tratadas, se produjo un incremento de amastigotes (Ama), y en las Cel tratadas con Genistein, KT5720 y SB203580 se produjo una disminución de Ama a las 72 h post-infección (p.i.). El número de Ama en Mo se correlacionó en forma inversa con la actividad de iNOS y en forma directa con la de ARG. El tratamiento con NOHA (inhibidor de ARG) anuló el aumento de Ama inducido por Cz en los Mo infectados. Además, KT5720 disminuyó la expresión de ARG I en Cel incubadas con Cz. Para conocer si esto ocurre in vivo se infectaron ratones BALB/c con 500 Tp y se estudió ARG en Mo peritoneales y el grado de infección en Mo de bazo a los 8, 15 y 19 días p.i. La actividad y expresión de ARG I fueron máximas en el día 19, donde se evaluó el efecto del tratamiento de los Mo ex vivo con los inhibidores mencionados. NOHA, KT5720 y SB203580, al igual que en los ensayos in vitro, fueron capaces de disminuir el número de Ama en los Mo infectados. La inhibición de múltiples señales intracelulares mediadas por PKA y p38 MAPK desfavorece el crecimiento intracelular de T. cruzi inducido por Cz en Mo.

18. (3830) GLUTAMATO DESHIDROGENASA DEL TRYPANOSOMA CRUZI INDUCE EN CÉLULAS B DE RATONES NORMALES UNA RESPUESTA T-INDEPENDIENTE MEDIADA POR CÉLULAS ACCESORIAS. MONTES, CAROLINA; ACOSTA RODRIGUEZ, EVA; ZUÑIGA, ELINA; MUCCI, JUAN; CAMPETELLA, OSCAR; GRUPPI, ADRIANA.

Inmunología, Fac Ciencias Químicas, UNC. Universidad de San Martín. Buenos Aires

Previamente describimos que Glutamato Deshidrogenasa (GDH) del *T. cruzi* es capaz de inducir en pacientes chagásicos una respuesta inmune temporal sin generar memoria inmunológica, comportándose como un antígeno T-Independiente(TI). Basándonos en estos antecedentes estudiamos "in vitro" las poblaciones blanco de GDH y la respuesta de las mismas frente a este antígeno. En cultivos celulares, mediante incorporación de Timidina H3, observamos que GDH (15 ug/ml) induce la proliferación de linfocitos (Li) B de bazo de ratones normales cultivados en presencia de macrófago (Mac) (cpm células con GDH 5000±112, cpm células con medio 100±12). Esta proliferación se produce en ausencia de LiT pero requiere de Mac. Los niveles de IL10 e INF-gama, determinados por Elisa, en los sobrenadantes de cultivo de LiB+Mac estimulados con GDH (1000±26 pg/ml y 3000±28 pg/ml respectivamente) fueron mayores que en los sobrenadantes de LiB+Mac sin estimular (100±12 pg/ml y 600±12 pg/ml). En estos sobrenadantes no se detectó IL4 ni IL12. Observamos, por citometría de flujo, que los LiB estimulados con GDH secretan INF-gama pero no de IL10. Por otro lado, Mac peritoneales activados con GDH (Mac-GDH) secretan mayor cantidad de IL6 (26,8±0,8ng/ml) e IL10 (707±15,1pg/ml) que Mac sin estimular (IL6: 9,09±4,4 ng/ml, IL10: 62±5,1pg/ml). Por RT-PCR detectamos que Mac-GDH presentan mayor expresión de BAFF y APRIL. Estos resultados nos permiten concluir que GDH es capaz de inducir la proliferación y secreción de citoquinas por parte de Li B murinos normales de forma T-independiente, a la vez que estimula en Mac la producción de citoquinas involucradas en la supervivencia y proliferación de LiB.

19. (3878) ROL DE LA ENZIMA SINTETASA DE ÓXIDO NÍTRICO (NOS) II MIOCÁRDICA SOBRE LA MULTIPLICACIÓN DEL TRYPANOSOMA CRUZI IN VITRO. FICHERA, LAURA E.; ALBAREDA, MARÍA C.; LAUCELLA, SUSANA A.; POSTAN, MIRIAM

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatale Chabén", ANLIS, Buenos Aires

Previamente hemos demostrado que IL-1b y TNF-a ejercen un efecto inhibitor del crecimiento parasitario e inducen la liberación progresiva de óxido nítrico (NO) en cultivos de cardiocitos infectados con *T. cruzi*. En este trabajo investigamos el rol del sistema iNOS/NO sobre la capacidad de las células cardíacas de producir NO y controlar el parasitismo celular in vitro. Se obtuvieron cultivos de cardiocitos de ratas Wistar neonatas, se infectaron con *T. cruzi* y se trataron con 10 ng/ml IL-1b, 100 ng/ml TNF-a, 500 U/ml de IFN-g y/o 1-2 mM de L-NAME, un antagonista competitivo de la actividad de la iNOS. La expresión de iNOS se evaluó en las células por "Western blot", el parasitismo celular mediante tinción con Giemsa, y la liberación de NO con el reactivo de Griess. Los resultados mostraron que IL-1b y TNF-a inducen la expresión de iNOS, tanto en cultivos de cardiocitos infectados con *T. cruzi* como en los controles no infectados, demostrando su participación en la producción de NO en los mismos. No se detectó expresión de iNOS en los cultivos estimulados con IFN-g. Sin embargo, los niveles de NO en los cultivos infectados estimulados con IFN-g fueron mayores respecto de los no estimulados (p<0.005), aunque significativamente menores que con el estímulo de IL-1b (p<0.01). Por otro lado, el porcentaje de células infectadas en los cultivos tratados con IFN-g fue significativamente menor que en los no tratados (p<0.001). El L-NAME revirtió parcialmente la producción de NO y la inhibición del crecimiento parasitario inducidos por IFN-g. Estos estudios demuestran que el efecto inhibitorio de las citoquinas sobre el crecimiento del *T. cruzi* en cardiocitos es mediado en parte por la iNOS, indicando un rol activo de la célula miocárdica en la resistencia al parásito.

NEFROLOGIA I

20. (3374) PAPEL COMPENSATORIO DE LA V-H(+)-ATPasa EN LA ACIDIFICACIÓN TUBULAR PROXIMAL DE RATAS

SENILES. FIORI, MARIANA; RADRIZZANI, MARTIN; DIAZ-SYLVESTER, PAULA; MÜLLER, ANGELICA; MONSERRAT, ALBERTO JUAN; AMORENA, CARLOS

Instituto de Investigaciones Cardiológicas ECyT, UNSAM; Fund CAMPOMAR; Dpto Patología, Fac de Med, UBA.

El envejecimiento es acompañado por un daño progresivo de la función renal. En ratas seniles encontramos una disminución de la acidificación tubular proximal, que fue mayor in vitro que in vivo. In vitro se redujo la cinética de acidificación del intercambiador Na(+)/H(+) un 80% y la expresión de la isoforma NHE3 más del 90%. In vivo se detectó una disminución del flujo de protones del 50%. La disminución observada podría estar compensada in vivo por un aumento en la expresión y/o actividad de la V-H(+)-ATPasa. Realizamos experimentos de micropuntura en condiciones de perfusión peritubular y luminal con y sin sodio y medimos el flujo de protones. Obtuvimos un "oligobody" que reconoce específicamente a la H(+)-ATPasa. Este se utilizó para determinar la presencia de la misma por Western blot en vesículas de membrana luminal de túbulo proximal de ratas Wistar macho: adultas jóvenes (3 meses) y seniles (18-20 meses). Advertimos que la reducción en el flujo de protones en experimentos sin sodio es sensiblemente menor en animales seniles comparado con los jóvenes: 0.567 ± 0.014 y 0.125 ± 0.01 nmolesxcm⁻²xseg⁻¹ respectivamente. La banda de 31 KDa correspondiente a la subunidad E de la H(+)-ATPasa perteneciente a las ratas seniles presenta una mayor intensidad y tamaño que la correspondiente a los animales jóvenes. En la inmunohistoquímica se detectan diferencias en el patrón de expresión de la proteína entre ratas seniles y jóvenes observándose una mayor presencia de la H(+)-ATPasa en corteza de riñones de animales seniles. La expresión aumentada de la V-H(+)-ATPasa y el mayor flujo de protones en los experimentos sin sodio en las ratas seniles podrían indicar que se produce un ajuste compensatorio a partir de un aumento en la expresión de esta enzima. Una parte importante de la recuperación de bicarbonato en el túbulo proximal de los animales seniles, normalmente efectuada a través del intercambiador Na(+)/H(+) en el adulto joven, se realizaría vía H(+)-ATPasa.

21. (3404) LA INHIBICIÓN DE LA ANGIOTENSINA II EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO RENAL EN RATA NORMAL. INSERRA, FELIPE; STELLA, INÉS; PAGLIA, NORA; FERDER, LEÓN; BASSO, NIDIA

ININCA Instituto de Investigaciones Cardiológicas. Facultad de Medicina, UBA. CONICET.

Previamente mostramos que la inhibición crónica de Angiotensina II (AngII) con Enalapril (E) o Losartan (L), desde el destete o mitad de la vida protege de cambios renales de la edad. A los 18 meses en ambos grupos se comparó efecto protector y capacidad de reversión del daño tisular con tratamiento tardío vs grupo Control (C). Ratas Wistar macho (n=81) se dividieron en grupos: C1(n=20); C2(n=7); E1(n=13); E2(n=10); L1(n=12); L2(n=11). Grupos 1 desde el destete y grupos 2 a los 12 meses. Se analizó un grupo C3(n=8) de 12 meses de edad. Los E recibieron 10 mg/kg/día y los L 30 mg/kg/día hasta los 18 meses. El riñón se fijó con formol 10%, se tiñeron con H&E y T. de Masson. Inmunomarcamos con anticuerpos monoclonales para alfa-SM-actina (a-Act) y colágeno III (CIII). Valoramos: dilatación tubular (DT), infiltrado inflamatorio (Inf.Inf), fibrosis (FR) con Tricómico, a-Act y CIII. A ciegas se usó índice de lesión: 0=normal; 1=leve; 2=moderada; 3=severa; 4=muy severa. Resultados: Media±SEM. *p<0.05 vs C correspondiente, #p<0.05 vs L (ANOVA).

	FR	DT	Inf.Inf	alfa-Act	CIII
C1	2.60±0.12	2.37±0.18	1.95±0.18	1.65±0.20	1.35±0.12
L1	1.08±0.17*	0.71±0.16*	1.21±0.14*	0.88±0.14*	0.62±0.14*
E1	0.46±0.12*#	0.31±0.11*	0.77±0.16*	0.50±0.14*	0.31±0.11*
C3	1.56±0.18*	0.81±0.30*	1.31±0.28	0.62±0.31*	0.62±0.23*
C2	2.86±0.18	2.07±0.35	2.07±0.33	1.50±0.24	1.57±0.20
L2	1.36±0.10*	1.09±0.18*	1.36±0.18	0.50±0.20*	0.95±0.11*
E2	1.35±0.18*	0.95±0.24*	1.10±0.30	0.45±0.20*	0.89±0.22*

La inhibición crónica de la AngII previene el daño renal secundario al envejecimiento en rata normal. El tratamiento iniciado en la mitad de la vida evita pero no revierte estos cambios.

22. (3431) EFECTOS DE BACLOFÉN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE ORINA Y LA ABUNDANCIA DE ACUAPORINA 2. DONATO, VERÓNICA; GARCÍA, VERÓNICA; TRUMPER, LAURA; ELÍAS, MARÍA MÓNICA; MONASTEROLO, LILIANA A.

Fundación Maciel Parque. CIUNR. CONICET

En trabajos anteriores demostramos que la administración in vivo del agonista GABA_B, baclofen (BAC), provoca una disminución en la capacidad de concentrar la orina. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta renal a baclofen en presencia de desmopresina. También se propuso estudiar los efectos de BAC sobre la abundancia de acuaporina 2 (AQP2) en condiciones basales y en presencia de desmopresina. Las ratas fueron inyectadas con BAC 1mg/Kg s.c. y una hora más tarde con desmopresina 1µg/100g s.c., o con los correspondientes vehículos. Inmediatamente, se ubicaron en jaulas metabólicas individuales, deprivadas de agua y comida, para la recolección de orina durante 16 horas. Se tomaron muestras de sangre y se extrajeron los riñones. Se separó médula y se obtuvieron fracciones enriquecidas en membrana plasmática para evaluar abundancia de AQP2 mediante técnicas de Western blot. Como se describió previamente BAC provocó, en condiciones basales, una disminución en la relación Oosm/Posm (C=3.96±0.71, n=5; BAC=1.85±0.12*, n=6) sin cambios en TcH₂O (C=4.45±0.36µl/min.100g). Se observó una disminución en la abundancia de AQP2 (Gel-Pro Analyzer, datos referidos al promedio de los controles en unidades arbitrarias: C=1.07±0.06, n=3; BAC=0.76±0.07*, n=4). En presencia de desmopresina, BAC no provocó modificaciones en Oosm/Posm (Cdes=7.57±0.20), TcH₂O (Cdes=7.36±0.17µl/min.100g), o abundancia de AQP2 (Cdes=3.29±1.27, n=4; BACdes=3.29±1.13, n=4). *p<0.05.

Estos resultados sugieren que la disminución en la capacidad de concentrar la orina inducida por BAC se debería a una disminución en la abundancia de AQP2 en membranas plasmáticas. Estos efectos no se observaron con la administración de desmopresina, indicando que el agonista GABA_B no modificaría la respuesta a vasopresina.

23. (3449) EFECTOS DE PARACETAMOL (APAP) SOBRE LA UNIÓN A MEMBRANA DE NA⁺, K⁺ ATPASA (NKA) EN CÉLULAS RENALES CORTICALES DE RATA. TRUMPER, LAURA; COUX, GABRIELA; MONASTEROLO, LILIANA A.; MOLINAS, SARA; ELÍAS, M. MÓNICA

Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. CIUNR CONICET. Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR

Previamente informamos que la administración in vivo de una dosis tóxica de APAP promueve un aumento de la cantidad de NKA en homogenados de corteza renal, en membranas basolaterales (MBL) y apicales (MA). La aparición de NKA en MA podría sugerir una deslocalización de la enzima. NKA se mantiene unida a MBL por interacciones con proteínas asociadas al citoesqueleto formando un complejo insoluble en detergentes. El objetivo del presente trabajo fue analizar la posibilidad de que APAP debilite la unión de la enzima a la membrana. Se trabajó con una suspensión en fresco de células corticales y se analizó la solubilidad en Triton X-100 de la NKA. La suspensión celular se incubó durante 30 min con distintas concentraciones de APAP (n= 6): 0 (C), 0.1, 1, y 10 mM. Luego de la incubación las células se lavaron, se tomaron muestras para la medición de lactato deshidrogenasa (LDH) y se las incubó con un buffer de extracción conteniendo 0.1% Triton X-100. Luego de centrifugación se separaron los sobrenadantes, representando la fracción Tritón soluble (TS), y los pellets (TI) se resuspendieron en buffer de extracción. Se detectó la presencia de las subunidades alfa[1] y beta[1] de NKA por Western blot. En todos los grupos experimentales la liberación de LDH no difirió del grupo C (8.0 ± 1%, n= 6).

Alfa[1] aumentó significativamente en TS con APAP 10 mM (% respecto de C: 157±10 %; p<0.05), mientras que no se detectaron variaciones en beta[1]. En TI se observó una tendencia a disminuir la cantidad de ambas subunidades. Los resultados nos permiten concluir que sin provocar daño letal, APAP promovería el desprendimiento de NKA de su unión a membrana, primer paso para una posible redistribución de la enzima, evento que explicaría las alteraciones en la reabsorción de sodio observadas previamente.

24. (3535) EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA DEPURACIÓN RENAL DE ANIONES ORGÁNICOS Y DE ALGUNAS VARIABLES QUE LA DETERMINAN EN RATAS CON OBSTRUCCIÓN URETERAL BILATERAL. VILLAR, SILVINA R.; BRANDONI, ANABEL; QUAGLIA, NORA B.; MARTINEZ*, ALEJANDRA I.; PICENA**, JUAN C.; TORRES, ADRIANA M

*Area Farmacología. Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R.. CONICET. *Area Morfología. Fac. Cs. Bioq. y Farm. **Cát.deAnatomía y Fisiología Patológicas. Fac. Cs. Médicas.UNR.*

En trabajos anteriores hemos demostrado modificaciones en el manejo renal de aniones orgánicos en ratas con obstrucción ureteral bilateral (OUB). El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la evolución temporal de la depuración renal de p-aminohipurato (PAH) y algunos de los parámetros que la determinan, en ratas Wistar macho adultas con OUB de 24 h. Los estudios se realizaron a: t=6 h (n=4), t=12 h (n=4), t=24 h (n=6) y t=48 h (n=4) postdesobstrucción. Se procesó un grupo paralelo de ratas Sham (S, n=13). Se determinaron: Urea en plasma (U), Clearance renal de PAH (CIPAH), mediante técnicas convencionales de Clearance, Actividad de la enzima Na-K-ATPasa y Abundancia del Transportador de Aniones Orgánicos (OAT1) en homogenatos de corteza renal. También se evaluó la histología renal. Se usó el test de ANOVA y Newman-Keuls, (*)P<0.05 vs S, (#)P<0.05 vs t=6, t=12, t=24. U(g/L); S: 0.55±0.02, t=6: 3.24±0.24*, t=12: 3.48±0.24*, t=24: 2.91±0.30*, t=48: 1.78±0.25*#. El CIPAH disminuyó significativamente en las ratas con OUB a valores inferiores al 20% respecto del grupo Sham. Na-K-ATPasa (umol Pi/h/mg Prot.); S: 16.04±0.65, t=6: 11.99±0.76*, t=12: 11.92±0.79*, t=24: 11.90±0.69*, t=48: 16.37±1.09#. OAT1(%): S= 100±3; t=6: 178±12*, t=12: 163±13*, t=24: 156±8*, t=48: 44±4*#. El epitelio tubular proximal mostró gránulos citoplasmáticos más numerosos y groseros al avanzar el tiempo, descamación celular y dilatación luminal; a partir de t=12 h se apreciaron además, imágenes de mitosis. Los animales con OUB presentaron una disminución en la depuración de PAH que se mantuvo en función del tiempo. Esto podría deberse, al menos en parte, a una modificación de la Abundancia de OAT1 o de la Actividad de la Na-K-ATPasa (dado que OAT1 es un transportador activo terciario dependiente de esa bomba).

25. (3551) MODIFICACIONES EN LA FARMACODINAMIA DE FUROSEMIDA EN RATAS CON COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA DE CORTA DURACIÓN. BRANDONI, ANABEL; QUAGLIA, NORA B.; VILLAR, SILVINA R.; MAC LAUGHLIN*, MYRIAM; TORRES, ADRIANA M.

*Area Farmacología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. CONICET *ININCA-UBA-CONICET*

Hemos demostrado alteraciones en parámetros hemodinámicos y tubulares renales en ratas con colestasis extrahepática de corta duración. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la farmacodinamia de furosemida (FS) en ratas Wistar macho adultas con ligadura del conducto biliar de 21 h de duración (L, n=6). Paralelamente se estudió un grupo de ratas Sham (S, n=5). Los animales fueron preparados para técnicas convencionales de clearance. Se les administró una dosis única seguida por una infusión continua (1 mL/h/100g p.c.) de una solución conteniendo inulina (18 mg/mL) y FS (0.9 mg/mL). Luego de 45 min de esta-

bilización se recolectaron dos períodos de clearance de 20 min cada uno. Se evaluaron las eficiencias de FS (Efi[FS], %) sobre las excreciones fraccionales (EF) de sodio (Na), potasio (K) y agua (H₂O). Estos parámetros se calcularon empleando la siguiente fórmula: Efi[FS] X = (EFdeXconFS - EFdeXsinFS)/Carga excretada de FS, siendo X la variable en estudio. Además se analizó la abundancia del cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2) en homogenatos renales. Se obtuvieron los siguientes resultados: Efi[FS] Na: S = 100 ± 14, L = 61 ± 10*; Efi[FS] K: S = 100 ± 22, L = 31 ± 3*; Efi[FS] H₂O: S = 100 ± 7, L = 68 ± 9*; NKCC2 (%): S = 100 ± 6, L = 142 ± 12* (*P < 0.05). Se evidencia una disminución en la eficiencia diurética, natriurética y calurética de la FS en ratas con colestasis extrahepática. La FS es un diurético que actúa inhibiendo el cotransportador NKCC2 presente en el asa ascendente de Henle. En relación a esto, se observó un aumento en la abundancia de este cotransportador. Estos resultados sugerirían que el déficit en la acción del diurético podría deberse, al menos en parte, al mayor número de cotransportadores observados en las ratas con colestasis extrahepática.

26. (3635) INFLUENCIA DE LA OVARIECTOMÍA SOBRE EL CRECIMIENTO RENAL COMPENSADOR Y EL SISTEMA KALIKREÍNA KININA. ODDO, ELISABET; AZURMENDI, PABLO; MUCHNIK, CAROLINA; MARTIN, RODOLFO; IBARRA, FERNANDO; ARRIZURIETA, ELVIRA

IDIM Alfredo Lanari, Fac Med, UBA

En trabajos previos encontramos que después de efectuar una nefrectomía unilateral (uNx) a los 90 días de vida, el crecimiento renal compensador (CRC) y el filtrado glomerular del riñón remanente, estimados a los 150 días de vida, diferían según sexo. En las ratas hembra (H) alcanzaron un 68% del peso del riñón control y en los machos (M) y H ovariectomizadas (oVx) un 77 y 79%. Además se observó que la excreción de Kalikreína urinaria (KU) se incrementaba en las HuNx y en las oVxuNx y no en los MuNx y que estos desarrollaban con el tiempo, hipertensión. En este mismo modelo estudiamos las características del CRC midiendo la relación Proteína/DNA y RNA/DNA (como marcadores de hipertrofia e hiperplasia) y el contenido de Kalikreína renal (KR) en ratas Wistar M, H, oVx con y sin uNx. Se extrajeron los riñones, se pesaron y se separó corteza de médula renal. En corteza se midió la KR utilizando un sustrato cromogénico, proteínas por el método de Bradford y DNA, RNA por espectrofotometría a 260nm. La KR (nkat/corteza/100g PC) fue un 50% en MuNx y HuNx respecto a sus controles (53.7±2.24 y 29.9±4.31 vs 102.6±5.53 y 58.5±7.33 respectivamente p < .01) en cambio la KR de las oVxuNx alcanzó el valor de los controles (53.9±4.75 vs 42.8±4.28). La relación mgProteína/ugDNA mostró un aumento en las ratas oVx y oVxuNx (235.1±7.4 y 288± 33.5) con respecto a los demás grupos que no evidenciaron diferencias entre sí (159.4±5.37, p < .05). La relación RNA/DNA mostró resultados similares (oVx 3.18 y oVxuNx 2.14 el resto de los grupos 1.51). Las ratas H, uNx u oVx tienen una mayor excreción de KU respecto de su contenido renal que los M enteros o uNx, a pesar que estos poseen el doble de KR, pudiendo este hecho obedecer a un defecto de liberación de la enzima. La oVx estimularía el CRC mediante una hipertrofia celular.

ONCOLOGIA I

27. (3697) LOVASTATÍN (LOV) POTENCIA LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DOXORRUBICINA (DOX) EN UN ADENOCARCINOMA MAMARIO (M-406) DE RATÓN, EXACERBANDO EL EFECTO ANTITUMORAL DEL TRATAMIENTO. ¹ROZADOS, VIVIANA R.; ¹HINRICHSEN, LUCILA I.; ²CUELLO CARRIÓN, F. DARÍO; ³CIOCCA, DANIEL R.; ¹SCHAROVSKY, O. GRACIELA

¹Inst. Genética Exp., Fac. de Cs. Médicas, U.N.R., Rosario ²Inst. Med. y Biol. Exp. de Cuyo, Centro Reg. de Invest. Científica y Tecnol., CONICET, Mendoza

Anteriormente demostramos el efecto antimetastásico de LOV in vivo. Otros autores comprobaron que LOV detenía el ciclo celular en G1 e inducía apoptosis. El efecto principal de la quimioterapia con DOX es detener las células en G2 e inducir apoptosis de las células tumorales. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto in vivo e in vitro del tratamiento combinado con LOV y DOX y evaluar la apoptosis inducida por el mismo. Suspensiones de células M-406 se distribuyeron en los grupos: A-I) Testigos, A-II) Tratadas con LOV 20 mM, A-III) Tratadas con DOX 8mg/ml y A-IV) Idem A-II A-III. Se incubó 24 h a 37°C y 5CO₂ y se evaluó la viabilidad celular (VC) con el método colorimétrico MTS/PMs. La VC en el Grupo A-IV [mediana (rango), Grupo IV: 22,25 (15-35)] fue significativamente menor (p < 0,05) comparada con el grupo A-I (100de VC). Los grupos A-II y A-III no difirieron del A-I pero si del A-IV. Ratones CBi portadores de M-406 fueron distribuidos en 4 grupos: B-I) Testigos, B-II) Tratados con LOV 25mg/kg, 3 veces/semana desde el día 5, B-III) Tratados con DOX 1m/kg, 2 veces/semana desde el día 11, B-IV) Idem B-II B-III. El tamaño tumoral en el día 21 en B-IV fue menor comparado con los otros grupos (p < 0,05) [cm³, media ± E.S; B-I: 3,08±0,62 vs B-IV: 1,8±0,24]. La apoptosis se vio aumentada en los grupos B-II, B-III y B-IV comparados con el B-I (p < 0,05), siendo mayor en el grupo B-IV. Resultados similares se obtuvieron al trabajar con un modelo de un linfoma de rata. Lovastatin, administrado en dosis no tóxicas, podría potenciar los efectos antitumorales producidos por DOX, exacerbando la apoptosis. De esta manera, su utilización en el tratamiento combinado permitiría reducir las dosis de DOX, disminuyendo la aparición de efectos tóxicos secundarios, pero conservando el efecto antitumoral de dosis mayores.

28. (3985) ZONA DE TRANSICIÓN TUMORAL: UN NUEVO MARCADOR MORFOLÓGICO Y FUNCIONAL DE AGRESIVIDAD EN TUMORES MURINOS Y HUMANOS. MEISS, ROBERTO; RUGGIERO, RAUL; BUSTUOABAD, OSCAR

Centro de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina

Previamente vimos que algunos ratones con tumores pequeños morían rápidamente mientras otros, con tumores similares o aun mayores, exhibían buen estado de salud. Para determinar la causa de esta diferente agresividad, que no era genética, sarcomas MCC de igual tamaño de ratones moribundos (M) o con buen estado de salud (B) fueron estudiados histológicamente. Se observaron 3 zonas intratumorales: la viva, la necrótica y una tercera no descripta previamente, la zona de transición, donde coexisten células tumorales vivas, necróticas y apoptóticas. La principal diferencia entre tumores de ratones M y B fue un número aumentado de capilares por campo en la zona de transición de tumores de M comparado a los de B, a saber: 36.3 ± 2 vs. 5.6 ± 0.8 (p 0.001); 27.6 ± 1.2 vs. 3.2 ± 0.5 (p < 0.01) y 15.5 ± 0.5 vs. 0.5 ± 0.2 (p < 0.002) en tumores de 5, 10 y 20 g respectivamente. En tumores de 5 g de M estos vasos mostraban un importante infiltrado inflamatorio. Resultados similares se obtuvieron con el sarcoma S-180, linfoma 2 P-2 y adenocarcinoma C7 HI. En tumores humanos se detectaron las tres zonas en 14/14 sarcomas y 41/ 65 carcinomas detectándose, también, una correlación entre un mayor número de vasos en la zona de transición y un peor pronóstico. Cuando a tumores MCC de ratones M se les extirpaban las zonas necróticas y de transición dejando indemne la zona viva, la salud se recuperaba; recíprocamente sobrenadantes de aquellas zonas pero no de la zona viva, generaban caquexia al ser inoculados i.p sugiriendo que factores tóxicos (TNF u otros) son producidos en aquéllas siendo vehiculizados a la circulación general por los capilares que irrigan la zona de transición. Esto significa que esta propiedad y no el tamaño tumoral conferiría mayor agresividad al tumor.

29. (3990) RELACIÓN ENTRE MASA TUMORAL Y EL ESTADO DE SALUD DE LOS RATONES PORTADORES DE TUMOR. RUGGIERO, RAUL; DI GIANNI, PEDRO; BUSTUOABAD, VICTORIA; MEISS, ROBERTO; BUSTUOABAD, OSCAR

Centro de Estudios Oncológicos. Academia Nacional de Medicina

Para determinar la relación entre masa tumoral y daño del organismo afectado por el tumor, 24 ratones BALB/c recibieron s.c. 1×10^5 células del fibrosarcoma murino MC-C. Aunque el tumor creció progresivamente en todos los ratones, una significativa variabilidad fue observada en la sobrevida y en el tamaño tumoral al momento de la muerte. Por ejemplo, hubo ratones ($n=4$) que murieron a los 30-35 días con tumores de 4-5 g y otros ($n=5$) que lo hicieron a los 50-55 días con tumores de 20-22 g. Además, hubo ratones que exhibían buen estado de salud con tumores hasta 4 veces más grandes que aquéllos que portaban algunos ratones moribundos. Similares resultados fueron obtenidos con el sarcoma S-180 ($n=13$), el linfoma 2P-2 ($n=30$) y el adenocarcinoma de mama C7HI ($n=28$). En segundo lugar estudiamos la relación entre metástasis y daño orgánico usando como modelo el tumor C7HI. A los 90, 100 y 110 días de crecimiento tumoral, ratones portadores de C7HI moribundos ($n=17$) mostraron un número de metástasis pulmonares (media=124, rango: 7-330) no significativamente mayor al de portadores de C7HI con una condición de salud regular (media=103, rango: 9-305, $n=27$) o buena (media=95, rango: 5-297, $n=24$). Además, el rango superpuesto de los grupos revela que ratones moribundos tenían un número de metástasis mayor, igual e incluso menor que aquéllos que exhibían un mejor estado de salud. Se puede concluir que una mayor masa tumoral y una mayor carga metastásica no son necesariamente indicativos de un peor pronóstico y, recíprocamente, que dos tumores aparentemente idénticos, con igual masa y tiempo de crecimiento, pueden inducir efectos marcadamente diferentes en la salud del organismo.

30. (3991) FACTORES TÓXICOS ASOCIADOS A LA CAQUEXIA INDUCIDA POR 4 TUMORES MURINOS.
RUGGIERO, RAUL; CAMERANO, GABRIELA; SCHERLEVY, CAROLINA; LOMBARDI, GABRIELA; MARTIN, ISTURIZ; MEISS, ROBERTO; BUSTUOABAD, OSCAR

Centro de Estudios Oncológicos. Academia Nacional de Medicina

En el resumen anterior vimos que al menos parte del efecto deletéreo ejercido por un tumor sobre el organismo estaba asociada a la vascularización de su zona de transición a través de la cual factores tóxicos en las zonas de transición y necrótica podrían vehiculizarse hacia el resto del organismo. En este trabajo investigamos cuáles podrían ser estos factores tóxicos. En dos sarcomas (MCC y S-180) uno de estos factores es TNF alfa. En efecto una alta concentración de éste fue detectada en el suero de ratones moribundos portadores de MCC (64 ± 2 UL50/0.1ml) y S-180 (73 ± 1) mientras que ratones con tumores MCC y S-180 de igual tamaño pero que exhibían buen estado de salud mostraban un título de TNF alfa normal ($p < 0.01$). Recíprocamente tratamiento con receptor dimérico para TNF unido a Fc humano revertía asombrosamente los síntomas caquéticos prolongando la sobrevida de 32 ± 2 a 52 ± 2 días para MCC ($p < 0.001$) y de 27 ± 2 a 57 ± 3 días para S-180 ($p < 0.001$). Se detectó además la presencia de TNF alfa y mRNA para TNF en las zonas de transición y necrótica pero no en la zona viva de los tumores MCC y S-180. Experimentos con clodronato (un veneno anti-macrófago) sugirieron que parte del TNF circulante fue producido por macrófagos intratumorales. Por otro lado experimentos análogos revelaron que TNF no cumple un rol significativo en los síntomas caquéticos asociados al linfoma 2P-2 y al adenocarcinoma mamario C7HI. En los 4 modelos fue, también, estudiada la participación de IL-1beta y IL-6 aunque no hay evidencia de su rol caqueticizante. La identificación de factores tóxicos, responsables de la caquexia asociada al tumor podría ayudar a diseñar métodos para retardar y aún revertir los síntomas.

31. (3993) ESTUDIO DE MUTACIONES EN TUMORES MURINOS CON DIFERENTE AGRESIVIDAD SOBRE EL ORGANISMO. RUGGIERO, RAÚL; BELLI, CAROLINA; BUSTUOABAD, OSCAR; MEISS, ROBERTO

Academia Nacional de Medicina

En la presentación anterior mostramos que dos tumores aparentemente idénticos, podían exhibir diferente agresividad sobre el organismo del ratón portador. Para determinar si esta diferente agresividad podía atribuirse a la aparición de una población mutante de células tumorales más malignas, variantes más y menos agresivas de los tumores MC-C, S-180, 2P-2 y C7HI fueron sometidas a un análisis de ADN genómico, buscando mutaciones en el protooncogén N-RAS. Este estudio se basó en experimentos de otros laboratorios que sugerían que mutaciones en el N-RAS podían oficiar como un exacerbador general del fenotipo transformado. Los resultados obtenidos revelaron que ninguna de las variantes de nuestros tumores exhibió mutaciones en los codones "calientes" 12 y 13 ya sea usando el método UHG (generador universal de heterodúplex) como el SSCP (polimorfismo conformacional de cadena simple); el control positivo fue la línea humana Molt-4, heterocigota para el codón 12. Aunque mutaciones en otros protooncogenes podrían subyacer la diferente agresividad de nuestros tumores, el siguiente experimento no favorece esta posibilidad: 1×10^5 células derivadas de tumores MC-C de igual tamaño creciendo en ratones moribundos (variante más agresiva) o que exhibían buen estado de salud (variante más benigna) fueron inoculadas s.c. en ratones normales. La sobrevida de los que recibían células MC-C de ratones moribundos fue 45.3 ± 6.1 días (rango: 35-55, $n=12$) no significativamente diferente de la mostrada por aquéllos que recibieron células MC-C de ratones en buen estado de salud: 43.3 ± 10.2 días (rango 29-63, $n=30$). Resultados similares se obtuvieron con S-180, 2P-2 y C7HI. Se concluye que la diferente agresividad de nuestros tumores no está asociada a características fijadas genéticamente. *Presentación de Trabajos Poster*

ENDOCRINOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN II

32. (3400) REVERSIÓN DE UN ESTADO INSULINO RESISTENTE POR ENUCLEACIÓN ADRENAL BILATERAL EN RATAS CON OBESIDAD HIPOTALÁMICA. MORENO, GRISELDA; PERELLÓ, MARIO; SPINEDI, EDUARDO

Lab. Neuroendocrinología. IMBICE Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE. CONICET-CICPBA. La Plata

La administración neonatal de monosodio L-glutamato (MSG) en ratas induce, en la vida adulta, un síndrome de obesidad caracterizado por elevados niveles circulantes de corticosterona, leptina e insulina. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la sensibilidad a insulina mediante el test de tolerancia i.v. a glucosa [TTIVG; 2 g/Kg de peso corporal (pc)] en ratas hembra controles (CTR) y MSG a los 21 días post enucleación adrenal bilateral (EA). Se tomaron muestras de sangre antes y a los 5, 15, 30, 60 y 90 minutos post-glucosa, en el plasma se determinó glucosa, insulina y leptina. Se disecó y pesó la masa adipocitaria visceral en los cuatro grupos. Los animales MSG-SHAM presentaron áreas bajo la curva en el TTIVG significativamente mayores al grupo CTR-SHAM en glucosa ($183,60 \pm 13,10$ vs $139,70 \pm 6,20$ g/l/90 min; $p < 0,05$), insulina ($513,26 \pm 58,22$ vs $221,12 \pm 39,17$ ng/ml/90 min; $p < 0,01$) y leptina ($209,44 \pm 22,41$ vs $45,98 \pm 6,13$ ng/ml/90 min; $p < 0,001$). Mientras que en los animales CTR la EA no modificó la respuesta al TTIVG, en los animales MSG-EA se observó una disminución de las áreas haciendo que no difieran de los CTR-EA. Los animales MSG-SHAM presentaron mayor masa adiposa visceral respecto CTR-SHAM (23.26 ± 1.08 vs 12.7 ± 1.08 g% pc; $p < 0.01$). La EA produjo una disminución de la masa adiposa visceral en ambos grupos (MSG-EA: $13,1 \pm 1,5$ y CTR-EA: $7,62 \pm 0,69$ g% pc; $p < 0.01$). Conclusión: La disminución transitoria de glucocorticoides, en animales MSG-EA, mejoró ciertas características del fenotipo de obesidad hipotalámica, tales como normalización de: a) la masa adiposa visceral, b) la leptinemia y c) la sensibilidad periférica a la acción de la insulina post-sobrecarga de glucosa. (PICT 5-5191/99).

33. (3555) EFECTO DE LA INSULINA SOBRE EL METABOLISMO INSULAR DE GLUCOSA. BORELLI, MARIA INES; FRANCINI, FLAVIO; GAGLIARDINO, JUAN JOSÉ

CENEXA-Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET, Centro Colaborador OPS/OMS)

El islote pancreático presenta receptores de insulina (I) y sus mediadores intracelulares. Estos últimos aumentan en respuesta a la glucosa. En islotes la I estimula la transcripción de su gen y el de glucoquinasa, el flujo de Ca(2+) del retículo endoplásmico y la exocitosis. Objetivo: Estudiar el efecto modulador autocrino de la I sobre el metabolismo (M) de glucosa (G) y la secreción (S) de I inducida por G en islotes de hamsters. Material y Métodos: Se midió la producción de (14)CO[2] y (3)H[2]O a partir de G-D-[U-(14)C] y G-D-[5-(3)H], en islotes incubados con G 0.6, 3, 8 y 16 mM e I (0.005-15 mU/ml), suero anti-I (1:500), wortmanina (W) 150 nM, o nifedipina (N) 25 µM. Se midió la S de I (RIA) en islotes incubados con G 3 y 16 mM con o sin W (75, 150 y 300 nM) en el medio. Resultados: La I aumentó la producción de (14)CO[2] (167%) y (3)H[2]O (87%) sólo en presencia de G 3 mM ($p < 0.001$). La adición de suero anti-I, W o N al medio disminuyó la producción de (14)CO[2] y (3)H[2]O sólo con 8 ((14)CO[2] : 51%, 49% y 51%; (3)H[2]O: 39%, 31% y 48%) y 16 mM de G ((14)CO[2] : 50%, 48% y 36%; (3)H[2]O: 26%, 30% y 51%) ($p < 0.02, 0.01, 0.01$, respectivamente). La I (15 mU/ml) revirtió el efecto de N. En islotes incubados en medio libre de Ca(2+) el M de G disminuyó 50% y no se corrigió agregando I. La W inhibió de modo dosis-dependiente la S de I estimulada por G 16 mM: $8.6 \pm 0.9, 4.3 \pm 0.5, 3.4 \pm 0.8$ y 2.5 ± 0.5 ng/islote/hora con G 16 mM sola y con 75, 150 o 300 nM W, $p < 0.05$. La disminución inducida por W sobre la S de I y el M de G fue de similar magnitud. La I modula positivamente el M de G insular y la S de I inducida por G por un mecanismo autocrino. Estos resultados permiten asumir que en casos de insulinoresistencia la menor respuesta a la I no sólo ocurriría en los tejidos periféricos sino también a nivel insular.

34. (3610) MORFOLOGÍA PANCREÁTICA Y RENAL EN LAS LÍNEAS DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE DIABÉTICAS ESS Y ESMT. ENFOQUE MULTIVARIADO. PICENA, JUAN CARLOS; MONTENEGRO, SILVANA; AZPEITÍA, NERINA; D'OTTAVIO, ALBERTO; MARTÍNEZ, STELLA MARIS; TARRÉS, MARÍA CRISTINA

Facultad de Ciencias Médicas. Consejo de Investigaciones. PIAD. UNR.

A fin de evaluar efectos del genotipo, del sexo y de la edad, se estudió con microscopía óptica la morfología insular y la presencia de lesiones renales en machos y hembras de 3 a 26 meses de las líneas de ratas con diabetes genética tipo 2 eSS ($n=136$) y eSMT ($n=124$). Se verificaron correlaciones significativas ($p < 0.001$) entre edad y cantidad de islotes chicos y grandes en eSS (0.32 y -0.29) y eSMT (-0.28 y -0.66), siendo mayor el número insular en hembras ($p < 0.01$). La frecuencia de fibrosis fue superior en machos eSS ($p < 0.01$) y en ambos géneros en eSMT mientras que la de nesidioblastosis no varió entre sexos ni líneas. A nivel renal, se constató engrosamiento de la pared arteriolar en machos eSS desde los 12 meses y en hembras desde los 21; en machos eSMT desde los 9 y desde los 12 en hembras. La fibrosis intersticial fue más frecuente en los machos que en las hembras eSS ($p < 0.05$). A los 12 meses, los diámetros glomerulares profundos (en micrómetros) fueron mayores en hembras eSS (120 ± 6 y 110 ± 8 , $p < 0.01$), no difiriendo entre sexos en eSMT (102 ± 9 y 106 ± 11). Mediante técnicas multidimensionales fueron construidos cuatro clusters que agruparon desde hembras con mayor área insular, sin tiroidización tubular ni infiltrados intersticiales renales de naturaleza inflamatoria (clase 1), hasta machos de edad superior al promedio general, con infiltrados intersticiales y glomerulos con expansión mesangial global y en oblea (clase 4). La conformación de una tipología multivariada permitió ordenar a los animales según severidad creciente, siendo el sexo la variable nominal de diferenciación. Este dimorfismo sexual en los ras-

gos histopatológicos de ambas líneas diabéticas, más tardíos y/o moderados en hembras, estaría asociado a las hormonas gonadales y coincide con la magnitud de alteraciones metabólicas previamente demostradas.

35. (3686) LECTINHISTOQUÍMICA NEFRÓNICA EN RATAS DIABÉTICAS TIPO 2 ADULTAS. FRONTINI, ANA VERÓNICA; HISANO, NORIYUKI; D'OTTAVIO, ALBERTO ENRIQUE

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR CIUNR

La nefropatía diabética puede indagarse mediante el estudio con lectinas (proteínas o glucoproteínas capaces de unirse específica y reversiblemente a radicales glucídicos). Fueron analizadas lectinhistoquímicamente estructuras nefrónicas en ratas macho de 1 año: 5 eSS, 5 eSMT (ambas diabéticas espontáneas tipo 2) y 5 Wistar (controles). Sus riñones fueron fijados en Bouin, refijados en formol al 10% en PBS, incluidos en parafina, los cortes fueron expuestos a PNA, Con-A, DBA, SBA, RCA, WGA, UEA-I y observados con microscopio óptico de investigación Zeiss. Se detectó: (1) entre diabéticas y controles: hiporreactividad para WGA en los glomerulos superficiales y yuxtamedulares (GS y GYM) y en la membrana basal de los túbulos contorneados proximales superficiales y yuxtamedulares (TCP S y YM) de las diabéticas y (2) entre las líneas diabéticas: hiporreactividad para WGA, PNA y DBA en el ribete en cepillo de los TCPS y TCPYM (en eSS) y para RCA (en eSMT). Entre diabéticas y controles, la disminución o ausencia de residuos glucídicos ligados al ácido siálico podrían atribuirse a su dismetabolismo. A su vez, la de aquéllos vinculados al ácido siálico y a distintos residuos galactosados entre eSS y eSMT podría depender de la condición híbrida y bi-dismetabólica de eSMT (resultante del cruce entre eSS y β - genéticamente obesa, hipertriglicéridémica y diabética tardía). En ambos casos, los datos suman información en favor de una nefropatía en evolución, revelada ya por otras técnicas en trabajos previos, pudiendo resultar de utilidad indicativa para la clínica nefrológica.

36. (3736) NUEVOS ASPECTOS MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN DE LA GLUCCOQUINASA CON SU PROTEÍNA REGULATIVA. FRANCINI, FLAVIO; BALTRUSCH, SIMONE; TIEDGE, MARKUS; LENZEN, SIGURD

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada Instituto de Bioquímica Clínica. Facultad de Medicina de Hannover, 30623, Alemania.

Glucoquinasa (GQ) es el sensor de glucosa (G) en células β pancreáticas y hepáticas. Se modula post-transcripcionalmente por interacción con la proteína regulativa de GQ (GRP), responsable de su translocación intracelular. Mediante phage display library screenings identificamos una secuencia consenso asparagina-leucina de unión a la GRP. Objetivo: caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en la interacción GQ-GRP. Materiales y Métodos: se empleó mutagénesis dirigida de aminoácidos específicos en GQ (Altered Sites II Mutagenesis System). Las interacciones moleculares GRP-GQ se caracterizaron por MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 2 y verificado por selección en placa y quimioluminiscencia cuantitativa (β -galactosidasa). La actividad de GQ se midió por fotometría. Resultados: La secuencia de unión se localizó en 3 áreas de la GQ: Leu309/Asn313 (A), Asn350/Leu355 (B) y Leu58/Asn204 (C). A se ubica en una secuencia señal de exportación nuclear mientras C en el sitio catalítico. Doble mutación Leu58/Asn204 y simple Leu58 y Asn204 generó pérdida total de interacción con GRP, disminuyendo significativamente la actividad enzimática. Doble mutación Asn350/Leu355 y simple Leu355 mantuvo su interacción GK/GRP aunque disminuida en 50% respecto a GQ salvaje. Interesantemente la doble mutación Leu309/Asn313 y la simple Asn313, aumentaron la actividad del gen reportero. Conclusión: Leu58/Asn204 en vecindad del bolsillo catalítico de GQ es esencial para su interacción con GRP. Leu309/Asn313 y

Asn350/Leu355, localizados en la superficie del lóbulo C-terminal de GQ modifican la afinidad por GRP. Mutagénesis dirigida de estos residuos abre nuevas perspectivas para generar GQ con afinidades mayores y menores por la GRP, permitiendo modulación dirigida de la regulación al corto plazo del metabolismo de G en hígado.

37. (3755) CAMBIOS FUNCIONALES Y MORFOLÓGICOS DE LAS CELULAS β PANCREÁTICAS INDUCIDOS POR INSULINORRESISTENCIA. POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN. DEL ZOTTO, HÉCTOR; GÓMEZ DUMM, CÉSAR; BORELLI, MARÍA INÉS; GARCÍA, M. ELISA; CHICCO, ADRIANA; LOMBARDO, YOLANDA; GAGLIARDINO, JUAN JOSÉ

CENEXA-Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET, Centro Colaborador OPS/OMS) Depto Cs. Biológicas, Fac. Bqca y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe

La ingestión crónica de sacarosa (S) induce insulinoresistencia (IR) y aumento de células β a los 6 meses por aumento de su replicación y disminución de apoptosis. Objetivo: Determinar en ratas Wistar normales los cambios cronológicos (6 y 12 meses) inducidos por ingestión de S en la morfología de células β (densidad de volumen [DV]) y la secreción de insulina. Material y métodos: Ratas alimentadas con almidón o dieta rica en S se sacrificaron a los 6 (S6) y 12 meses (S12) estudiándose secreción de insulina (SI, en islotes aislados incubados con glucosa [G] 2 a 16mM) y morfometría (inmunocitoquímica [células β y no β], INGAP, Pdx-1 y PCNA). Resultados: Las ratas S6 mostraron cambios significativos ($p < 0.05$) en: glucemia (8.1 ± 0.1 vs 6.6 ± 0.2 mmol/L), insulinemia (55 ± 4.9 vs 50.8 ± 5.8 μ U/ml(-1)[NS]), DV de células β (0.9 ± 0.02 vs $0.4 \pm 0.02\%$), células Pdx-1+ (0.6 ± 0.1 vs 0.2 ± 0.04) y aumento en la replicación de células β (0.3 ± 0.1 vs 0.04 ± 0.03). No hubo cambios en DV de células INGAP+. En ratas S12 disminuyó significativamente la insulinemia (23 ± 2 vs 58.8 ± 0.2 μ U/ml(-1)), DV de células β (0.5 ± 0.07 vs 0.9 ± 0.09) y células Pdx-1+ (0.2 ± 0.04 vs 0.4 ± 0.02). No hubo cambios significativos en la replicación de células β ni en la DV de células INGAP+. SI en S6: G 2,4,8,12 y 16 mM: 1.6 ± 0.3 vs 1.9 ± 0.3 NS; 1.2 ± 0.3 vs 2.2 ± 0.3 , $p < 0.05$; 3.1 ± 0.4 vs 8.1 ± 1.1 $p < 0.001$; 9.8 ± 1.3 vs 14 ± 1.6 $p < 0.05$; 19.3 ± 3 vs 21 ± 3 NS. SI en S12: 0.7 ± 0.04 vs 0.4 ± 0.04 NS, 0.6 ± 0.02 vs 0.51 ± 0.1 NS, 2.43 ± 0.2 vs 0.9 ± 0.04 ($p < 0.05$), 9.5 ± 0.9 vs 11 ± 2.3 NS, 16 ± 1.7 vs 21.8 ± 1.2 ($p < 0.05$). La IR inducida por S aumenta a los 6 meses la SI y DV de las células β (aumento de replicación sin neogénesis) con ligera hiperglucemia. La reacción funcional y morfológica adaptativa a la IR se agota a los 12 meses con aparición de diabetes.

38. (3762) EFECTO DEL INGAP (PROTEÍNA ASOCIADA A LA NEOGENESIS INSULAR) SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA DE ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATAS ADULTAS. BORELLI, MARÍA INÉS; BOSCHERO, CARLOS; STOPPIGLIA, FABRIZIO; REZENDE, LUIS; FLORES, LUIS; DEL ZOTTO, HÉCTOR; GAGLIARDINO, JUAN JOSÉ

CENEXA-Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada, Centro Colaborador OPS/OMS Departamento de Fisiología y Biofísica, Instituto de Biología, UNICAMP, Campinas, Brasil

El INGAP modula el crecimiento de células insulares. Nuestro grupo demostró la presencia de ARNm de INGAP en islotes de hamsters normales y el aumento de células INGAP+ en animales con hiperplasia y neogénesis insular debida a insulinoresistencia inducida por administración de sacarosa. Objetivo: estudiar la morfología y secreción de insulina (SI) en respuesta a glucosa (G), arginina (A) y leucina (L) en islotes de rata cultivados con INGAP. Material y Métodos: Islotes aislados (digestión colagenasa) de páncreas de ratas Wistar adultos se cultivaron 4 días en RPMI 1640 con 5% de suero bovino fetal,

1% de estreptomycin/penicilina, 10 mM de G, con o sin INGAP (30 μ M). Luego se preincubaron grupos de 5 islotes 45 min en Krebs Ringer bicarbonato (KRB), con G 5.6 mM. Posteriormente se incubaron 1 h en KRB con G 3, 8 y 16 mM, 10 mM de L o A. La insulina liberada se midió por RIA. Los islotes se procesaron para inmunohistoquímica (antiinsulina y Pdx1). Resultados: El INGAP aumentó la SI en respuesta a G, L y A. Secreción de insulina (ng/islote/h; Control vs. INGAP): G 3 mM: $1.1 \pm 0.1^*$ vs 5.2 ± 0.2 ; G 8 mM: 4.4 ± 0.3 vs 33.3 ± 2.8 ; G 16 mM: 11.5 ± 0.9 vs. 31.8 ± 1.3 ; G 8 mM+A10 mM: 10.4 ± 0.5 vs 36.0 ± 2.9 ; G 8 mM + L10 mM: 9.8 ± 0.4 vs. 34.3 ± 1.3 . (*media \pm EEM, n=6; C vs INGAP, $p < 0.05$). Inmunomorfometría: Se registró aumento de tamaño de las células β sin cambios en el % de células Pdx1+. Conclusiones: Se demuestra por primera vez que el INGAP aumenta la respuesta secretora de las células β y produce hipertrofia de las células β sin aumento de su número. En consecuencia, el INGAP podría ser una alternativa terapéutica de personas con secreción de insulina disminuida.

39. (3774) EFECTOS DE UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CA-ATPasa (PMCA) Y SU RELACIÓN CON LA SECRECIÓN DE INSULINA (SI). ALZUGARAY, MARÍA EUGENIA; GARCÍA, M. ELISA; GAGLIARDINO, JUAN JOSÉ.

CENEXA-Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET, Centro Colaborador OPS/OMS).

Objetivo: Observar el efecto de la insulinoresistencia inducida por una dieta rica en fructosa sobre la secreción de insulina y la expresión de las distintas isoformas de la (PMCA) en islotes de rata. Materiales y métodos: Se usaron ratas Wistar machos divididas en dos grupos experimentales: uno tratado con fructosa (F) al 10% en el agua de bebida durante tres semanas y otro control (C). Al inicio y luego del tratamiento se valoraron la glucemia (G) y los triglicéridos (TG) plasmáticos. Con islotes pancreáticos aislados con colagenasa se midieron (SI) por RIA y las PMCA (Western blot) con anticuerpos específicos 5F10 y NR2. Resultados: No se observaron diferencias en los valores de (G) entre ambos grupos, mientras que los (TG) fueron significativamente mayores en los animales F. La (SI) fue mayor en las ratas F en presencia de 8, 12 y 16 mM de glucosa ($p < 0.02$, 0.01 y 0.001 respectivamente); con concentraciones menores no hubo diferencias significativas. No se observaron diferencias en la expresión de las PMCA entre ambos grupos experimentales en presencia del anticuerpo 5F10 que reacciona con las diferentes isoformas de PMCA, mientras que hubo una disminución en la expresión de la isoforma 2, cuantificada con el anticuerpo NR2, en los animales F (intensidad neta: F 22161 vs 5757 C). Conclusión: La insulinoresistencia inducida por la dieta rica en fructosa produce una disminución en el umbral de respuesta a la glucosa que correlaciona con un descenso en la expresión de PMCA 2.

40. (3779) CONTENIDO Y ACTIVIDAD DE HEXO Y GLUCOQUINASA INSULAR EN HAMSTERS CON INSULINORRESISTENCIA INDUCIDA. MAIZTEGUI, BÁRBARA; BORELLI, M. INÉS; GAGLIARDINO, JUAN JOSÉ.

CENEXA-Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET, Centro Colaborador OPS/OMS).

La administración de dieta rica en sacarosa (S) a hamsters normales induce insulinoresistencia (IR), acompañada de aumento del metabolismo de glucosa, de la relación hexo/glucoquinasa insular y disminución del umbral de secreción de insulina en respuesta a la glucosa. Objetivo: Estudiar en islotes de hamsters normales alimentados con S la correlación entre actividad y contenido de hexoquinasa y glucoquinasa. Material y Métodos: Hamsters (21 días) recibieron durante 5 semanas una dieta estándar (C) o con S al 10% en el agua de bebida (S). Se midió la glucemia (método enzimático) e insulinemia (RIA) y se aislaron islotes mediante digestión con colagenasa. Se cuantificó la proteína de hexo y glucoquinasa insular mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. La densidad de las bandas se

determinó con una cámara digital Kodak DC290 y el software correspondiente (Kodak 1D). Resultados: (valores expresados como $X \pm EEM$; $n = 12$; S vs C). Glucemias (mg%): 120 ± 4.4 vs 117 ± 3.8 , NS. Insulinemias (ng/ml): 11.6 ± 1.52 vs 2.1 ± 0.4 , $p < 0.001$. No se registraron diferencias significativas en la masa proteica insular de glucoquinasa (intensidad neta: 26826 ± 17.6 vs 24353 ± 17.3), ni en el contenido de glucoquinasa citosólica entre ambos grupos (intensidad neta: 10595 ± 25.8 vs 11556 ± 28.9). Por el contrario, la intensidad de la banda de hexoquinasa fue mayor en los animales alimentados con S (69575 ± 44.31 vs 30475 ± 39.02). Nuestros resultados sugieren que en los animales con IR la masa aparente de hexoquinasa aumentó sin cambios significativos en la de glucoquinasa. Estos cambios coinciden con los cambios registrados en la actividad de estas enzimas y serían parte de la adaptación insular a la mayor demanda de insulina.

41. (3968) EFECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA SOBRE LA ACTIVIDAD LINFOCITARIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO. WALD, MIRIAM RUTH; GENARO, ANA MARÍA; MOTTA, ALICIA; PAGOTTO, ROMINA; GUELMAN, LAURA; CREMASCHI, GRACIELA.

CEFAYBO - CONICET, Primera Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA.

Clínicamente se ha descrito un paralelismo entre el estado diabético y la inmunosupresión, así como también una correlación entre la hiperglucemia y el desarrollo de complicaciones en la diabetes, con participación del estrés oxidativo. En este trabajo se estudió el efecto de altas concentraciones de glucosa (Glu) sobre la funcionalidad linfocitaria y la distribución de subpoblaciones. Asimismo se evaluó el estrés oxidativo y la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) dada su participación dual en el daño oxidativo. Observamos que la proliferación celular -inducida por mitógenos selectivos para linfocitos T (LT) o B (LB) y medida por incorporación de [3H]-timidina- fue inhibida por el cultivo, durante 24 hrs, con Glu (1g%) (LT: $42 \pm 8\%$; LB: $28 \pm 7\%$ de inhibición, $n = 5$, $p < 0.01$). Esta respuesta fue acompañada por una disminución de la viabilidad celular (Control LT: $80.0 \pm 2.2\%$, LB: $75.3 \pm 3.3\%$; Glu LT: $69.3 \pm 2.3\%$, LB: $55.9 \pm 4.2\%$, $n = 4$, $p < 0.05$) y presencia de células con morfología celular apoptótica (por tinción con Hoescht). No se observaron diferencias significativas en la distribución de subpoblaciones CD4+ y CD8+. El estrés oxidativo -estudiado a través de la detección intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) y de ensayos de peroxidación lipídica (PL) cuantificándose el malondialdehído formado- se incrementó con Glu (incremento del $78 \pm 6\%$ de ROS y $128 \pm 13\%$ de PL, $n = 3$). Asimismo, Glu disminuyó la actividad de NOS, determinada por la formación de [14C]-citrulina en un $24 \pm 3\%$ ($n = 4$). Los resultados indican que altas concentraciones de glucosa inducen una menor actividad linfocitaria e incrementan el daño oxidativo, implicado en la inducción de la muerte celular. Los mismos podrían explicar la incidencia clínica de inmunosupresión en los pacientes con diabetes.

ENDOCRINOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN III

42. (3238) INTERACCIONES LACTOTROPO-ADIPOCITARIAS EN UN MODELO DE DENERVACIÓN HIPOTALÁMICA Y DIETA HIPERLIPÍDICA. LUNA, GEORGINA; CAMIHORT, GISELA; JURADO, SUSANA; GOMEZ DUMM, CESAR; SPINEDI, EDUARDO; CONSOLE, GLORIA

CATEDRA "B" DE HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA - FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS - U.N.L.P. Instituto Multidisciplinario de Biología Celular. IMBICE (CONICET-CICPBA)

Las áreas más sensibles al glutamato monosódico (MSG) son la eminencia media-núcleo arcuato y se dañan durante el desarrollo postnatal temprano. La diferenciación, crecimiento y función

secretora de las células lactotropas, dependen de la producción de hormonas hipotalámicas y de factores paracrinos y autocrinos locales. El presente trabajo investigó los cambios inmunohistoquímicos morfológicos de la población lactotropa en un modelo experimental de obesidad. Ratas hembras 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-PRL-EnVision (Dako) - DAB. Los parámetros estereológicos fueron analizados mediante un sistema de videomicroscopía (Optimas). El único grupo que mostró diferencias significativas * ($p < 0.05$), fue el de animales sometidos a DH con MSG, presentando descenso de la densidad de células (DC) y de la densidad de volumen (DV).

	Dieta normal (DN)	Dieta normal (DN)	Dieta hiperlipídica (DH)	Dieta hiperlipídica (DH)
PRL	sin MSG	con MSG	sin MSG	con MSG
DV ($\times 10^{-2}$)	20.5 ± 1.8	17.8 ± 1.4	19.4 ± 1.2	$15.8 \pm 1.1^*$
DC ($\times 10^{-4}$)	52.6 ± 4.5	50.4 ± 5.6	48.9 ± 3.2	$41.7 \pm 2.7^*$
TC (μm^2)	39.4 ± 1.4	37.4 ± 1.2	39.9 ± 1.1	38.2 ± 0.6

Concluyendo, la DH con MSG ocasiona hipoplasia de lactotropas, sin cambios en el tamaño celular.

43. (3399) EFECTOS DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL SOBRE LOS NEUROTRANSMISORES AMINOACÍDICOS HIPOTALÁMICOS. CATALANO, PAOLO NICOLÁS; SILVEYRA, PATRICIA; BIANCHI, MARÍA SILVIA; LUX-LANTOS, VICTORIA; LIBERTUN, CARLOS

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET

Recientemente demostramos un neto dimorfismo sexual de la expresión ontogénica de las subunidades del receptor GABAB en hipófisis de rata (Neuropharmacology 40;185, 2001), la que es modulada por testosterona (T) durante el desarrollo. Como GABA puede modular la expresión de sus receptores, aquí estudiamos si GABA también está involucrado en nuestro modelo. Determinamos los niveles de GABA y otros neurotransmisores (NT) aminoacídicos, en el hipotálamo (HT) de ratas infantiles frente a distintos tratamientos que modifican T. Modelos: hembras de 8 días (H8), H8 tratadas con $1 \mu g/día$ de testosterona (propionato: PT) los días 1-4 de vida (H81PT), H8 tratadas con $100 \mu g$ PT el día 1 (H8100PT), H8 tratadas con flutamida (FI, antiandrógeno) en etapa embrionaria [e17-e23; FI: $2.5 mg/100g$ de peso de madre preñada] (H8FI), machos de 8 días (M8), M8 castrados el día 1 (M8C), M8 tratados con FI en e17-e23 (M8FI) y M8 tratados con FI y castrados el día 1 (M8FIC). Fueron decapitados el día 8, se extrajeron y congelaron HT y corteza (control). GABA, glutamato, aspartato y taurina se determinaron por HPLC. El contenido de GABA hipotalámico en M8 ($\mu moles/g$ de tejido: 3.43 ± 0.15) es menor que en H8 (4.21 ± 0.08 ; $p < 0.05$). En H8100PT GABA disminuye al nivel de M8 (H8100PT: 3.42 ± 0.10 vs M8: ns). En M8FIC GABA se eleva al nivel de H8 (M8FIC: 4.22 ± 0.23 vs H8: ns). GABA en HT siguen un patrón muy semejante al descrito para el receptor GABAB1a hipofisario ($r = 0.79$, $p < 0.02$). Los otros NT hipotalámicos y los NT en corteza no siguen este patrón, es decir, habría especificidad de NT y región. Concluimos que T en la etapa embrionaria modifica los valores de GABA en HT y que GABA podría regular la expresión de los receptores GABAB en hipófisis. (CONICET-UBA-ANPCYT)

44. (3510) LOCALIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL Y EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE BAJO Y ALTO PESO MOLECULAR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO-2 (FGF-2) EN TUMORES HIPOFISIARIOS INDUCIDOS POR ESTRÓGENOS. MUKDSI, JORGE; DE PAUL, ANA; AOKI, AGUSTIN; TORRES, ALICIA

Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Introducción: La familia de factores de crecimiento fibroblástico juegan un rol crítico en la organogénesis hipofisaria, en la diferenciación de lactotropas y en el desarrollo de prolactinomas. Nos planteamos determinar la localización ultraestructural del FGF-2 y cuantificar la expresión de sus isoformas de 18 y 22 kDa en hipófisis de rata normales y tumorales. **Materiales y métodos:** Ratas Wistar, machos controles y estimuladas con benzoato de estradiol por 7, 20 y 60 días (n 15/grupo). Se realizó inmunocitoquímica por microscopía fotónica y electrónica y western blot de fracciones nucleares y citoplasmáticas de homogenatos hipofisarios de ratas control y tratadas. Los resultados fueron correlacionados con el número de células lactotropas y los niveles de PRL séricos. Estadísticamente analizados por ANOVA-Tukey y test de correlación. **Resultados:** FGF-2 se inmunodetectó tanto en grupos controles como estimulados. Por microscopía fotónica, a los 7d. se distribuye difusamente en la glándula, mientras que a los 20 y 60d. predomina en áreas neovascularizadas. Por microscopía electrónica se determinó su localización en citoplasma, núcleo y nucleólo de células lactotropas, somatotropas y gonadotropas. La isoforma 18kDa fue detectada en fracción citosólica, mientras que la de 22kDa fue visualizada en núcleo. Ambas incrementan en forma progresivamente significativa entre los diferentes tiempos del tratamiento estrogénico y en relación al control. Se demostró correlación ($p < 0.05$) con la proliferación de lactotropas y los niveles séricos de PRL. Se destaca la localización ultraestructural del FGF-2. en los diferentes tipos celulares hipofisarios normales y tumorales, participando ambas isoformas por mecanismos auto y paracrinos en el desarrollo de prolactinomas.

45. (3514) PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) ALFA Y ÉPSILON EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LACTOTROPAS NORMALES Y EN LA LÍNEA TUMORAL GH3B6. PETITI, JUAN PABLO; DE PAUL, ANA; AOKI, AGUSTÍN; TORRES, ALICIA

Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

INTRODUCCIÓN La PKC es una familia de isoformas involucradas en la transducción de señales en procesos proliferativos. Están sobreexpresadas en una gran variedad de células tumorales, convirtiéndose en blanco atractivo en la terapia del cáncer. Dada la escasa información sobre cuales isoformas participan en la proliferación de células lactotropas; el objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de algunas isoformas de PKC en cultivo primario hipofisario y en la línea tumoral GH3B6 correlacionada con el grado de proliferación celular en ambos modelos. **MATERIALES Y MÉTODOS** Se realizaron cultivos primarios de adenohipofisis de ratas hembras y de la línea GH3B6 tratadas al éster de forbol (PMA) a diferentes tiempos para lograr activación y desregulación de la PKC: 15 min y 5 h respectivamente. La proliferación de células lactotropas se cuantificó por inmunomarcación con bromodeoxiuridina y PRL. La expresión de las isoformas de PKC en los modelos experimentales fue determinada por western blot. Los resultados fueron analizados por ANOVA-Tukey. **RESULTADOS** La expresión de la PKC alfa y epsilon, se incrementó significativamente en la línea tumoral con respecto al cultivo primario hipofisario. La estimulación con 50 nM PMA por 15 min estimuló la proliferación en los dos modelos, mientras que la desregulación de la actividad de la PKC (PMA por 5 h) reflejada en disminución de la proliferación celular, solo se observó en cultivos normales.

La sobreexpresión de la PKC alfa y epsilon, visualizada en la línea tumoral GH3B6 se correlacionó con la alta tasa de proliferación cuantificada en estas células, aún en exposiciones prolongadas con PMA. Estos resultados confirman la participación de estas isoformas en la proliferación de células lactotropas en los modelos analizados.

46. (3550) INTERACCIÓN DE ESTRADIOL E IGF-1 EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LACTOTROPAS IN VITRO: PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA. GUTIERREZ, SILVINA; DE PAUL, ANA; PETITI, JUAN PABLO; AOKI, AGUSTÍN; TORRES, ALICIA; ORGNERO, ELSA

Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

INTRODUCCIÓN: La acción proliferativa del estradiol (Es) es ampliamente conocida. Sin embargo se han reportado efectos antimitogénicos en diversos tipos celulares. En el presente trabajo se investigó la acción de esta hormona y su interrelación con IGF-1 en células lactotropas in vitro y la posible participación de la proteína quinasa C (PKC) en el proceso proliferativo. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se realizaron cultivos primarios adenohipofisarios de ratas hembras adultas tratados durante 72h con Es (1nM) e IGF-1 (30ng/ml), solos y combinados. En paralelo, las células fueron co-incubadas con IGF-1 y genisteína (Ge), inhibidor del receptor tirosina-quinasa. La proliferación de lactotropas fue valorada por doble detección inmunocitoquímica de bromodeoxiuridina y prolactina. Se cuantificó la expresión de PKC-epsilon, isoforma involucrada en procesos proliferativos, por Western Blot. El análisis estadístico se realizó por el test ANOVA-Tukey. **RESULTADOS:** El IGF-1 aumentó significativamente el número de células lactotropas en proliferación. La administración conjunta de IGF-1/Es e IGF-1/Ge provocó una disminución de la actividad mitogénica, aunque sin alcanzar los valores del control. La estimulación con IGF-1 indujo un incremento de la expresión de PKC-epsilon, mientras que la co-incubación de IGF-1/Es y de IGF-1/Ge mostró una disminución de los niveles de esta isoforma. La administración de Es a bajas dosis revierte parcialmente el efecto proliferativo inducido por IGF-1 en células lactotropas. El aumento de la expresión de las PKC, en particular de la isoforma epsilon, en presencia de IGF-1 y su disminución por acción del Es, sugieren la participación de las PKC en este proceso proliferativo. Además, estos resultados permitirían comprender la acción antimitogénica del Es observada en las condiciones experimentales ensayadas.

47. (3622) EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR GABAB EN LA PITUITARIA: EFECTO DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL. BIANCHI, MARÍA SILVIA; BONAVENTURA, MARÍA MARTA; FERNANDEZ, MARINA; BETTLER, BERNHARD; LIBERTUN, CARLOS; LUX-LANTOS, VICTORIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental Buenos Aires. Universidad de Basilea, Suiza

Demostamos que las subunidades del receptor GABAB (RGABAB) presentan una expresión ontogénica sexualmente dimórfica en hipófisis de ratas (Neuropharmacol. 40:185:2001). Aquí se investigó el rol de la testosterona (T) perinatal en este evento. Modelos: hembras 8 y 15 días (H8, H15), H8 tratadas con 1 µg/día de propionato de T (TP) los días 1-4 de vida, H8 y H15 tratadas con 100 µg TP el día 1, H8 tratadas con flutamida (Fl), antiandrógeno: 2.5 mg/100 g peso de madre preñada, días embrionarios 17-23), machos de 8 y 15 días (M8, M15), M8 y M15 castrados el día 1, M8 tratados con Fl como antes, M8 tratados con Fl y castrados el día 1. Las ratas fueron decapitadas, se recolectó sangre troncal e hipófisis. Se determinó la expresión de las subunidades GABAB1a/b del RGABAB en membranas de pituitarias por Western Blot con el antisuero Ab174.1, usando sintaxina como control de carga. LH, FSH y T se midieron por RIA. La expresión de GABAB1a/b fue mayor en H8 que en H15 o M8 (GABAB1a (AU): H8: 0.98±0.08 vs H15: 0.46±0.6 vs M8: 0.56±0.02, $p < 0.01$). 100 µg TP en H8, pero no en H15, disminuyó la expresión de GABAB1a/b a nivel de machos ($p < 0.05$). 1 µg TP, o Fl, no alteró en H8 la expresión de las subunidades. En M8, Fl, sola o Fl más castración, aumentó la expresión de GABAB1a/b a niveles de H8, aunque la castración sola no fue efectiva (GABAB1a (AU): M8-castr: 0.67±0.06, M8-Fl: 0.81±0.05, M8-Fl-

castr: 0.97 ± 0.03). 100 µg TP, pero no 1 µg TP, alteró LH y FSH séricas a los 8 días, aunque ambos tratamientos androgenizaron efectivamente a los animales, como se evidenció por la falta de ciclicidad y pico de LH en ratas que alcanzaron la adultez. Concluimos que serían los andrógenos, actuando pre y postnatalmente, quienes modifican la expresión de las subunidades del R-GABAB adenohipofisarias. (CONICET-UBA-Ministerio de Salud-Universidad de Basilea).

48. (3642) ACCIÓN DE GNRH-II EN HIPÓFISIS DE RATA: RECEPTOR DE GNRH TIPO I VS RECEPTOR DE GNRH TIPO II. MONGIAT, LUCAS; LUX-LANTOS, VICTORIA; LIBERTUN, CARLOS

IBYME - CONICET

El decapeptido hipotalámico GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) presenta varias isoformas. Las variantes GnRH-I y GnRH-II se han detectado en diversos mamíferos con amplia distribución central y periférica. Se detectaron dos tipos de receptores de GnRH, GnRHR tipo I y GnRHR tipo II en humano, macaco, oveja, musaraña y ratón. El GnRHR tipo I presenta una mayor afinidad por GnRH-I, mientras que el GnRHR tipo II es más selectivo por GnRH-II. Previamente reportamos que GnRH-II libera en células hipofisarias de rata, LH y FSH con similar potencia que GnRH-I (Neuroendocrinol. 74:202-12). En otro trabajo sugerimos la presencia de GnRH-II en cerebro de rata (Neuroendocrinol. 75:326-38). Para determinar el mecanismo por el cual GnRH-II libera LH y FSH, estudiamos la producción de inosítoles fosfato (IP) luego de estimular con GnRH-I, GnRH-II y con el compuesto 135-18, agonista selectivo de GnRHR tipo II y antagonista de GnRHR tipo I. Utilizamos cultivos de hipófisis de rata hembra de 15 días (n=4). El valor control (c) de IP[[3]] (cpm/0.5x10((6))cel/30min) fue 163 ± 12 . GnRH-I y GnRH-II estimularon IP[[3]] de manera dosis dependiente ($10((-6))M$, 1772 ± 135 y 1483 ± 82 resp, $p < 0.001$ vs c; $10((-8))M$ 1521 ± 74 y 1094 ± 67 resp., $p < 0.001$ vs c). 135-18 no estimuló la producción de IP[[3]] ($10((-6))M$, 165 ± 9 ; $10((-8))M$, 194 ± 14 ; ns vs c), pero revirtió el efecto de GnRH-I al coincubarlos a $10((-6))M$ (393 ± 72 , ns vs c). Resultados similares fueron observados para la determinación de IP[[1]] e IP[[2]]. La respuesta para la liberación de LH y FSH muestra el mismo patrón. Estos resultados fueron corroborados en cultivos de hipófisis de machos adultos y hembras en proestro. Estos datos sugieren que GnRH-II actúa en las células hipofisarias de rata a través del GnRHR tipo. (CONICET, UBA, ANPCYT).

49. (3668) ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE CITOQUINAS GP130 EN LA REGULACIÓN DE LA TUMORIGÉNESIS HIPOFISARIA EN UN MODELO AUTO-PARÁCRINO CÉLULA LACTOSOMATOTROFA-CÉLULA FOLÍCULO ESTRELLADA (FS). GRACIARENA, MARIANA; CALERO, CECILIA; GIACOMINI, DAMIANA; CARBIA NAGASHIMA, ALBERTO; PEREZ CASTRO, CAROLINA; ONOFRI*, CHIARA; RENNERT*, ULRICH; STALLA*, GÜNTHER K.; ARZT, EDUARDO

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA
* Department of Endocrinology, Max Planck Institute Munich, Germany

Diversos estudios postulan a las citoquinas gp130 como reguladores de la tumorigénesis hipofisaria. Está descrita la dependencia de una línea celular lactosomatotrofa (MtT/S) por una línea celular FS secretora de citoquinas gp130 (TtT/GF) para la generación de tumores in vivo. Nuestro objetivo fue evaluar la participación de gp130 en la estimulación auto-parácrina de la proliferación de las MtT/S. Generamos clones estables que sobreexpresan gp130 (gp130-S), de expresión inhibida (gp130-AS), y clones control (pcDNA3) (gp130-C). Los clones gp130-AS tienen bloqueada la señalización de gp130: activación de STAT3 (P-STAT3) y actividad transcripcional STAT-3, frente a citoquinas gp130. En estudios de proliferación, gp130-C y gp130-S responden a citoquinas gp130, mientras que gp130-AS no responden a

este estímulo pero sí a un estímulo independiente. La actividad secretora de GH y PRL frente a citoquinas gp130 no se modificó en ninguno de los clones. Al ser inyectados a ratones nude, los clones solos a concentraciones altas generan tumores per se, y la coinyección con células TtT/GF genera tumores de tamaño similar. A concentraciones bajas la coinyección de clones con TtT/GF genera tumores de mayor tamaño que los clones inyectados solos. En todos los casos gp130-AS generan tumores significativamente menores. En estudios de inmunohistoquímica para CD31, la densidad de vasos es menor en tumores derivados de la coinyección de gp130-AS y TtT/GF que en tumores derivados de MtT/S wt o gp130-S más TtT/GF. Estos resultados evidencian el rol patogénico de gp130, y el modelo auto-parácrino descripto constituye una herramienta para comprender en mayor detalle la participación de gp130 en regular la comunicación y comportamiento celular que lleva al desarrollo de adenomas hipofisarios.

50. (3913) CAMBIOS EN EL PERFIL DE ISOFORMAS DE PROLACTINA HIPOFISARIA EN UN MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO HEMBRA QUE DESARROLLA PROLACTINOMA. CARINO, MÓNICA; GONZÁLEZ-CALVAR, SILVIA; CÓNSOLE, GLORIA; POUTANEN, MATTI; HUHTANIEMI, ILPO; CALANDRA, RICARDO; RULLI, SUSANA

Instituto de Biología y Medicina Experimental Fac. Medicina, UNLP y UBA; Fac. Cs. Exactas, UNLP; Dept. of Physiology, Univ. Turku, Finlandia

La prolactina (PRL) existe como múltiples variantes estructurales, que incluyen formas monoméricas, poliméricas, glicosiladas, fosfatadas o clivadas. El objetivo de este trabajo consistió en analizar el perfil de isoformas de PRL hipofisaria, de acuerdo a su peso molecular y grado de glicosilación, en un modelo de ratón transgénico (TG) que desarrolla prolactinoma (Rulli y col., Endocrinology, 2002). Estos ratones expresan elevados niveles de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), la cual estimula la producción de esteroides ováricos. Como un efecto dependiente del ovario, el modelo presenta hiperplasia de hipófisis a los seis meses de edad, y desarrollo de tumor adenohipofisario a los 12 meses. Se demostró por inmunohistoquímica, la presencia de células productoras de PRL en las hipófisis de TG a los 6 y 12 meses de edad. El peso hipofisario (mg) a los 6 meses fue: cepa salvaje (WT): 2.3 ± 0.1 , TG: 15 ± 0.5 ($p < 0.01$); a los 12 meses: WT: 3 ± 0.1 , TG: 130 ± 37 ($p < 0.01$). La PRL sérica (RIA; µg/ml) a los seis meses fue: WT: 0.043 ± 0.004 , TG: 3.2 ± 0.2 ($p < 0.01$); a los 12 meses: WT: 0.10 ± 0.02 , TG: 82 ± 39 ($p < 0.01$). Se separaron las isoformas de PRL a partir de citosoles de hipófisis por cromatografía en Sephadex G-100. La fracción correspondiente a pesos moleculares de 14-35 KDa fue: WT 6-12 meses 73%-80%, TG 6 meses 67%, TG 12 meses 41%. La fracción de 35-56 KDa aumentó similarmente en TG de 6 y 12 meses (WT: 7%, TG: 14%). La fracción de 56-130 KDa sólo aumentó en los tumores TG a los 12 meses (WT: 16%, TG: 42%). No se encontraron diferencias entre los grupos en las fracciones obtenidas por Concanavalina A. Estos resultados muestran que el perfil de isoformas de PRL hipofisaria se modifica en función del desarrollo de un tumor murino secretor de PRL, detectándose una mayor proporción de estructuras de alto peso molecular, posiblemente correspondientes a formas poliméricas de la hormona.

GENETICA I

51. (3471) ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR DE GRANDES DELECCIONES EN EL GEN DEL FACTOR VIII DE COAGULACIÓN HUMANO. ROSSETTI, LILIANA CARMEN; CANDELA, MIGUEL; PÉREZ BIANCO, RAÚL; DE TEZANOS PINTO, MIGUEL; LARRIPA, IRENE; DE BRASI, CARLOS DANIEL

Academia Nacional de Medicina Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina

En hemofilia A (HA) el análisis directo de la mutación causal en el gen del factor VIII (FVIII) constituye la ruta ideal para la provisión de asesoramiento genético. A pesar de su alta frecuencia, el análisis de las grandes deleciones (GD) es a menudo no abordado debido a su alta complejidad y laboriosidad. El objetivo de este trabajo es proponer un abordaje para el diagnóstico de portadoras mediante la detección y análisis directo de GD. Los métodos utilizados incluyen ampliificaciones PCR standard y de larga distancia (LD-PCR). Se estudiaron muestras de probandos de 38 familias con HA severa y negativas para las grandes inversiones del gen del FVIII. Primero, identificación de GD por PCR de regiones génicas codificantes (35 amplicómeros) cuando falla consistentemente la amplificación de una serie contigua de productos. Segundo, aplicación de LD-PCR desde regiones no involucradas, en cada GD para permitir su detección específica en heterocigosis. En un total de 64 familias con HA severa se detectaron 7 (11%) GD (rango 3,8-158 kb): (1) D[Promotor-exón1-int1h1], (2) D[exón3-26], (3) D[exón10-11], (4) D[int1h1-exón2-12], (5) D[exón10-18], (6) D[exón4-10], (7) D[exón23-26]. En 5/7 (71%) casos se detectó inhibidor. Se obtuvieron señales GD-específicas por LD-PCR en los casos 5 y 6, de 2,1 y 5,7 kb, respectivamente; y esto permitió determinar la condición de portadora en una hermana y en una madre de hemofílico. Los datos de frecuencia y riesgo relativo de inhibidor resultan similares a los reportados en la literatura. El abordaje presentado permite la provisión de información segura y confiable para asesoramiento genético en familias con HA severa y valioso para que el médico clínico considere cuando diseñe los protocolos de tratamiento y seguimiento de la enfermedad.

52. (3492) DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE: DIAGNOSTICO MOLECULAR PRENATAL. FERREIRO, VERONICA; GILIBERTO, FLORENCIA; DALAMON, VIVIANA; FERNANDEZ, CECILIA; PIAGGIO, NATALIA; SZIJAN, IRENE

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA *Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.*

La Distrofia Muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD) es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes (1:3500). Es recesiva, ligada al X, con síntomas clínicos progresivos y de evolución fatal. La alteración molecular responsable de esta patología se debe a mutaciones en el gen de la distrofina (locus Xp21). En las familias con antecedentes de la enfermedad, es posible realizar un diagnóstico precoz sobre una muestra de vellosidades coriónicas. Se realizó el estudio molecular prenatal en seis familias con antecedentes de DMD con el fin de predecir el estado de portador de la mutación y el futuro fenotipo de los fetos. La identificación de deleciones se realizó mediante PCR simplex y multiplex, y el análisis de segregación de alelos polimórficos mediante el estudio de 11 STRs intragénicos (DYS II, 7A, 24-28, 44A, 44B, 44C, 45, 49, 50, 62 y 79). Las muestras analizadas comprendieron 2 vellosidades coriónicas de sexo femenino y 5 de sexo masculino (2 de ellas correspondientes a mellizos dicigóticos). Los resultados obtenidos de los estudios moleculares permitieron excluir a 3 vellosidades de sexo masculino (una de ellas correspondiente a uno de los mellizos) de portar la mutación, e incluir a los otros 2 como futuros afectados. Una de las vellosidades femeninas no pudo excluirse de ser posible portadora y la otra no fue informativa debido a la contaminación de la muestra con sangre materna. Se quiere demostrar la importancia de la utilización conjunta de métodos directos e indirectos, con varios marcadores, como herramienta para el diagnóstico prenatal de familias con antecedentes de Distrofia Muscular de Duchenne/Becker.

53. (3497) IDENTIFICACION DE MUTACIONES GERMINALES EN PACIENTES CON RETINOBLASTOMA POR TECNICAS

DIRECTAS E INDIRECTAS. DALAMON, VIVIANA; FERNANDEZ, CECILIA; GILIBERTO, FLORENCIA; FERREIRO, VERONICA; PIAGGIO, NATALIA; SZIJAN, IRENE

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. *Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

El retinoblastoma (RB) es un tumor ocular maligno que afecta niños hasta 4-5 años. Se origina por mutaciones en el gen RB1 (13q14). El objetivo fue el estudio de 2 pacientes con RB hereditario de novo, de acuerdo a las características clínicas de presentación. El análisis del gen RB1 se realizó mediante: 1) segregación de alelos polimórficos (BamHI-intrón 1, RbI4-intrón 4, XbaI-intrón 17 y RB1.20-intrón 20) utilizando el ADN de leucocitos del paciente y familiares; 2) identificación de mutaciones pequeñas por PCR-Heteroduplex- Secuenciación. Pacientes: Caso 1) detectado a los 2 meses y Caso 2) a los 20 meses, ambos RB bilateral sin antecedentes familiares. El análisis de polimorfismos en el Caso 1 reveló que el paciente era hemocigota para RB1.20, por ausencia del alelo materno debido a una deleción en la región 3' del gen. El análisis por PCR-Heteroduplex-Secuenciación de los 27 exones en el Caso 2, identificó una deleción puntual (G.150104delC) en el exón 18, con alteración en el marco de lectura y aparición de codón Stop prematuro, generándose una proteína trunca no funcional. Las mutaciones descriptas no se encontraron en los familiares analizados. El análisis de ambas mutaciones en el ADN de leucocitos demostró su origen germinal, confirmando la forma hereditaria del tumor. Utilizando dos técnicas de estudio se identificaron dos mutaciones diferentes (una deleción grande y una puntual) en el gen RB1. Se excluyó a los hermanos de ambos pacientes de ser portadores de la enfermedad por no presentar la mutación. Por lo tanto, al aplicar ambas técnicas de estudio se aumenta la informatividad, brindando así un correcto asesoramiento genético a las familias.

54. (3499) NEUROFIBROMATOSIS TIPO I: DIAGNOSTICO MOLECULAR. FERREIRO, VERÓNICA; GILIBERTO, FLORENCIA; DALAMON, VIVIANA; PIAGGIO, NATALIA; FERNÁNDEZ, CECILIA; SZIJAN, IRENE

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. *Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.*

La Neurofibromatosis Tipo1 (NF1) es una enfermedad genética en la cual los individuos afectados desarrollan tumores generalmente benignos en el sistema nervioso. Se origina por mutaciones en el gen supresor tumoral NF1. El diagnóstico se basa actualmente en los criterios clínicos establecidos por el NIH, sin embargo, la identificación del gen NF1 permitió comprender las bases moleculares de esta enfermedad y nuestra investigación ayudará a establecer herramientas para un diagnóstico más rápido y preciso. Estrategia de trabajo: Se obtiene DNA de leucocitos del paciente y sus familiares y DNA tumoral. Se realiza la segregación de alelos polimórficos mediante PCR radiactiva de 3 STRs intragénicos (IVS26, IVS27, IVS38), para identificar el cromosoma con el gen mutado en los casos de NF1 familiar y analizar la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el tumor en los casos esporádicos. Resultados: - Se analizó un tumor en el cual se evaluó la pérdida de heterocigosidad de los marcadores analizados. No se observó LOH. - Se analizaron cuatro familias con NF1 familiar. El estudio de segregación de alelos polimórficos resultó informativo para todas ellas. En el primer caso, dos de las cuatro hijas analizadas fueron excluidas de ser posibles portadoras de la mutación y las otras dos fueron incluidas. En el segundo caso se identificó el cromosoma ligado a la mutación, información sumamente valiosa para el análisis de futuros integrantes de la familia. En el tercer caso los tres hijos varones de un padre afectado, heredaron el mismo cromosoma paterno. En el cuarto caso se confirmó el diagnóstico clínico de un hijo, se incluyó a otro y se excluyó a un tercero de ser portador de la mutación. Se quiere recalcar la importancia del estudio molecular

del gen NF1 como herramienta diagnóstica en los casos de NF1 familiar y en los casos esporádicos en los que se tenga acceso a material tumoral.

55. (3508) BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN GENES RELACIONADOS CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO SIN BOCIO. ESPERANTE, SEBASTIAN; RIVOLTA, CARINA; MIRAVALLE, LUCRECIA; HERZOVICH, V.; IORCANSKY, SONIA; TARGOVNIK, HECTOR

Catedra de Genética y Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica Laboratorio de Pesquisa de Enfermedades Congénitas, Hospital Garrahan

El hipotiroidismo congénito presenta una incidencia de 1:3000 en nuestro país y un 85 % de los casos se deben a agenesia, disgenesia e hipoplasia tiroidea. Entre los genes asociados a este tipo de hipotiroidismo se encuentran el receptor de TSH (rTSH) y los factores de transcripción PAX8, TTF-1 y TTF-2, en los cuales se describieron mutaciones. En el presente trabajo se realizó la búsqueda de mutaciones en los exones y en las uniones intrón/exón 3 al 8 del gen PAX8 y 1, 2 del gen del rTSH en 20 pacientes con evidencia bioquímica de hipotiroidismo congénito sin bocio. Las técnicas utilizadas fueron PCR-SSCP y secuenciación. Al observarse diferencia en la movilidad electroforética por SSCP en dos casos estudiados se procedió a secuenciarlos. Se identificó en un paciente con hipoplasia tiroidea un cambio heterocigota 834 C>T en el exón 7 de PAX8, que corresponde a un cambio de treonina por metionina (T225M), variación también presente en el padre. La secuencia aminoácídica fue enviada al sitio de internet nnPredict-UCSF para la predicción de su estructura secundaria y explorar los posibles efectos de la mutación. En la proteína mutante la presencia de metionina en la posición 225 puede causar una extensión de la alfa-helice desde el residuo 226 hasta el 228. En un paciente con atireosis se observó un cambio heterocigota 206 G>C en el exón 1 del rTSH que corresponde a un cambio de aspártico por histidina (D36H), también presente en el padre. Para ambos exones, se comparó por SSCP el patrón de migración electroforética del paciente con 50 normales (100 cromosomas), no observándose el patrón diferencial de corrida de los exones que presentan la mutación, por lo cual se descarta que se tratan de polimorfismos. En conclusión se describieron 2 nuevas mutaciones en la secuencia de los genes PAX 8 y rTSH. Futuros estudios funcionales indicarán el efecto de estos cambios de aminoácidos sobre la función del factor de transcripción PAX8 y del receptor de TSH.

56. (3660) HIPERTRIGLICERIDEMIA Y POLIMORFISMO DE APOLIPOPROTEÍNAS EN DIABÉTICOS TIPO 2. ALMARÁ, ADRIANA M.; SOLAND, MELISA A.; BOUVET, BEATRIZ R.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, IBR. CIUNR, Departamento de Bioquímica Clínica

La hipertrigliceridemia es una alteración lipídica frecuente en la Diabetes Mellitus (DM) tipo 2. En la población no diabética algunos estudios han sugerido una asociación entre hipertrigliceridemia y variaciones genéticas en los locus de apolipoproteína (apo) CIII y apoE aunque sin evidencias concluyentes. El objetivo de este trabajo fue evaluar la relación entre estos factores genéticos y niveles de triglicéridos (TG) en individuos con DM tipo 2. Se determinaron los lípidos plasmáticos y se analizaron el polimorfismo SstI del gen de apoCIII: alelos S1 y S2 (por PCR y RFLP con SacI) y los genotipos de apoE: alelos E2, E3 y E4 (por ASA-PCR). Los individuos se clasificaron como hipertriglicéridémicos (HTG, n=21; TG>200 mg/dl) o normotriglicéridémicos (NTG, n=24; TG<180 mg/dl). El grupo HTG presentó mayores niveles de TG que el NTG: HTG= 319 ± 111 mg/dl vs. NTG= 127 ± 41 mg/dl, (p<0,001), mostrando valores similares en los parámetros lipídicos restantes. La frecuencia de portadores del polimorfismo SstI (S2) fue similar en los dos grupos estudiados: HTG vs. NTG= 21% vs. 15% (p=0,26). En cambio, la distribución de los genotipos comunes de apoE: E2/3, E3/3 y E4/3, difirió significativamente entre ambos grupos siendo res-

pectivamente: 9,5%, 52,5% y 38% para HTG, y 8,3%, 79,2 % y 12,5% para NTG (p<0,05). En el grupo HTG los portadores del alelo E4 mostraron mayores valores de TG que los no portadores, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. Los resultados no indican relación entre niveles de TG plasmáticos y alelo S2 de apoCIII en la muestra de sujetos diabéticos analizada. Por otra parte la mayor frecuencia del genotipo E4/3 en el grupo HTG sugiere una asociación entre hipertrigliceridemia y alelo E4 de apoE en individuos con DM tipo 2.

57. (3776) CUANTIFICACIÓN DE LA DELECIÓN COMÚN 4977 PB DEL ADN MITOCONDRIAL. SU RELACIÓN CON MUERTE SÚBITA. POLISECKI, ELIANA; SALA, ANDREA; SCHREIER, LAURA; CORACH, DANIEL

Cátedra de Genética y Biología Molecular - Servicio de Huellas Digitales Genéticas. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

La delección común de 4977 pb del ADN mitocondrial (4977-ADNmit) se detecta con el aumento de la edad. La cuantificación del acúmulo de esta delección sería indicador de daño oxidativo. Los mecanismos que llevan a la muerte súbita en el adulto (MSA) no están aclarados, alrededor del 80% son por isquemia cardíaca asociado a su vez a mayor estrés oxidativo. Objetivos: I- Establecer condiciones para la cuantificación de 4977-ADNmit. II- Cuantificar 4977-ADNmit en muestras provenientes de fallecidos por MSA. Se obtuvieron 13 muestras de músculo cardíaco de víctimas de MSA de 18 a 69 años. El ADN extraído se cuantificó y se diluyó de 300 a 25 ng para amplificar el fragmento de 389 pb que muestra presencia de delección, y de 75 a 0.1 ng para amplificar un fragmento de 440 pb del ADNmit total. Se fotografiaron los productos de dilución en el gel de agarosa para cuantificarlos con el software Image Quant 5.1. A partir del gráfico semilog de disminución de DO de los productos de PCR en función de ng de ADNmit se calculó regresión lineal y la proporción de ng de 4977-ADNmit con respecto a ADNmit total. La aplicación del método a muestras de MSA demostró: mediana (rango) 8.9x10⁻⁵ (1.07x(-12) a 0.035). Subdividiendo las muestras según la distribución de edad, <=35y >=51, el % de 4977-ADNmit fue, media±ES: 0.0021±1.55x10⁽⁻⁴⁾ y 0.0089±5.29x10⁽⁻³⁾, respectivamente, sin diferencias significativas y la correlación con edad r= 0.29, p=0.32. Las víctimas jóvenes han presentado una proporción de delección similar a los de mayor edad indicando una posible asociación con MSA, independiente de la edad.

58. (3838) ANÁLISIS DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS SECUNDARIAS EN LINFOMAS NO HODGKIN (LNH). CERRETINI, ROXANA; NARBAITZ, MARINA; SLAVUTSKY, IRMA

Academia Nacional de Medicina Deptos de Genética y Patología, Centro Nac de Genética Médica

Los LNH se caracterizan por presentar cariotipos con múltiples anomalías cromosómicas, siendo escasa la información respecto de las anomalías que acompañan la progresión tumoral. En este trabajo se evaluó la frecuencia y distribución de anomalías secundarias (AS) en 40 pacientes con LNH: 12 Linfomas Foliculares (LF), 19 Linfomas B Difusos de Células Grandes (LBDCG) de novo y 9 LBDCG secundarios a LF (LBDCG-S). Se efectuó cultivo de médula ósea y/o biopsia ganglionar. Se empleó técnica de bandeado G e hibridación in situ con fluorescencia. Se encontraron 55 AS estructurales diferentes, 34/55 (62%) fueron deleciones cromosómicas: 11/34 (32%) en LF, 15/34 (44%) en LBDCG y 8/34 (23%) en LBDCG-S. Las translocaciones cromosómicas representaron el 22% (12/55) de las AS: 4/12 (33%) fueron observadas en LF, 5/12 (42%) en LBDCG y 3/12 (25%) en LBDCG-S, siendo el 67% (8/12) desbalanceadas. Las restantes anomalías representaron el 26% (9/34). Los puntos de ruptura 1q21 (LF), 7q32 y 12q13 (LBDCG), 6q21, 9q11 y 12p13 (LBDCG-S) fueron los más comprometidos, observándose pérdida recurrente de material genético de las regiones 6q21, 7q32, 9p11 y 12p13. En LF, los cromosomas 1 y

3 fueron los más afectados en AS estructurales, observándose recurrencia de dup(1)(q21q32) y del(6q21), en LBDCG el cromosoma 8 en diferentes anomalías y recurrencia del(7)(q32) y en LBDCG-S los cromosomas 6 y 9, con recurrencia de del(6)(q21) y del(9)(q11). Entre las AS numéricas, la trisomía 21 fue la más frecuente en LF, la trisomía 12 en LBDCG y la trisomía 2 en LBDCG-S. El análisis de los patrones citogenéticos muestran que estos tres grupos de LNH tienen diferentes AS, la mayoría con desbalance genómico, sugiriendo que dichas entidades presentarían mecanismos de progresión tumoral característicos.

59. (3841) COPROPORFIRIA HEREDITARIA. ESTUDIOS GENÉTICOS. PARERA, VICTORIA ESTELA; KOOLE, RITA; BATTLE, ALCIRA; DE ROOIJ, FELIX

DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLÓGICA FCEN-UBA-CIPYP-CONICET Lab. Internal Medicine II, University Hospital Rotterdam, Holanda

La Coproporfirina Hereditaria (CPH) es una enfermedad metabólica producida por una deficiencia en la coproporfirinógeno III oxidasa (CPO), sexta enzima del camino metabólico del hemo. La CPH es una porfiria mixta, los pacientes pueden presentar síntomas abdominales y/o cutáneos. Bioquímicamente, la actividad disminuida de CPO produce la acumulación hepática de coproporfirina y su excreción por orina y heces. Durante los ataques, el porfobilinógeno y el ácido delta aminolevulico urinarios están aumentados. El gen que codifica para la CPO humana contiene 7 exones y abarca 14kb del DNA genómico; el cDNA codifica para una proteína de 323 aminoácidos. Hasta hoy, se han caracterizado 33 mutaciones y 8 polimorfismos en el gen humano de la CPO: 23 sustituciones nucleotídicas, 3 mutaciones de splicing, 4 pequeñas deleciones, 2 pequeñas inserciones y una gran deleción. El DNA genómico se aisló de sangre periférica proveniente de 4 familias con CPH no relacionadas utilizando el kit InstaGene Whole Blood (Bio Rad). Los 7 exones del gen CPO incluyendo las regiones intrónicas adyacentes se amplificaron y secuenciaron con el DNA sequencing kit (Applied Biosystems) y se utilizó un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). Se detectaron 4 mutaciones nuevas: una mutación puntual g/a en la posición +5 del sitio donador de splicing del intrón 6 (IVS6+5g/a), una mutación puntual en el exón 6 que cambia una tirosina (TAT) por una cisteína (TGT) (Y392C), una mutación puntual a/c en el sitio aceptor de splicing del intrón 2 (IVS2-29c) y la deleción de una C en el exón 1 (279delC). Este es el primer estudio genético en pacientes argentinos con CPH en los que se encontraron 4 mutaciones aún no descritas, lo cual confirma la heterogeneidad genética de las porfirias.

HEMATOLOGÍA I

60. (3388) LA ELIMINACION DE MACRÓFAGOS (M) UTILIZANDO CLODRONATO ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS (L-C) AUMENTA EL NÚMERO DE PRECURSORES DE MEGACARIOCITOS (MK) EN MEDULA ÓSEA (MO) Y BAZO (B). LANDONI, VERONICA; VERMEULEN, MONICA; GOMEZ, SONIA; VAN ROOIJEN, NICO; PALERMO, MARINA; ISTURIZ, MARTIN; ALVES-ROSA, FERNANDA

Academia Nacional de Medicina Vrije Universiteit. Amsterdam.

Previamente demostramos que la eliminación de M utilizando clodronato encapsulado en liposomas (L-C), induce un aumento del recuento de MK en MO y B de ratones BALB/c. En este trabajo evaluamos el efecto del tratamiento sobre los precursores de MK. Para ello, se determinó el número de unidades formadoras de colonias de MK (UFC-MK) en cultivos de MO y B de animales tratados con L-C 76µg, liposomas vacíos (L-V) o salina (SF) y estimulados con trombopoietina, IL-3 y IL-11. A los 20 días de cultivo, las UFC-MK fueron identificadas con un microscopio invertido. Los resultados (UFC-MK/10(6) cél ± SEM) fueron: MO: SF: 10.5±2.8;

L-V: 20.3±7.5*; L-C: 74.2±7.3*; *p<0.001, vs SF; ANOVA (n=6). En B: SF: 0.7±0.6; L-V: 10.8±0.5*; L-C: 24.5±5.3*; *p<0.01 vs SF; ANOVA (n=4). Por otra parte, se evaluó la especificidad del efecto observado. Para ello, las células de B y MO fueron estimuladas con factor estimulador de colonias granulocito-macrófagos (GM-CSF). Los resultados (UFC-GM/10(6) cél ± SEM) fueron: MO: SF: 123.3±17.3; L-V: 69.3±26.4*; L-C: 57.3±24.6*; *p<0.001, vs SF; ANOVA (n=4). B: SF: 49.7±11.8; L-V: 31.8±6.4; L-C: 16.7±6.7*; *p<0.05 vs SF; ANOVA (n=3). Por otra parte, en estos cultivos también se identificaron UFC-MK siendo los valores (UFC-MK/10(6) cél ± SEM) MO: SF: 13.3±3.7; L-V: 10.4±3.2; L-C: 67.7±8.3*; *p<0.001, vs SF; ANOVA (n=3). En B: SF: 0.2±0.2; L-V: 11.7±4.5*; L-C: 23.7±6.7*; *p<0.01 vs SF; ANOVA (n=3). Estos resultados indican que el tratamiento con L-C induce un aumento del número de precursores de MK en forma específica.

61. (3393) RELACIÓN ENTRE LA FRACCIÓN A2 DE LA HEMOGLOBINA Y EL RDW. ZERDIEW, ANA B; VAZQUEZ VARGAS, DANIEL; CELEBRIN, LUCIA; AGRA, MARCELA

Htal. de Agudos E. Tornú Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

OBJETIVOS: El Índice de Distribución de los glóbulos rojos (RDW), ha sido estudiado como parámetro orientador para diferenciar ferropenias de talasemias. Se analizaron los resultados de la hematimetría y electroforesis de hemoglobina de 103 pacientes, para establecer la correlación existente entre el valor porcentual de la fracción A2 Hemoglobina (A2Hb), y del (RDW). MÉTODOS: Los rangos de los índices hematimétricos fueron los siguientes: Hto = (24,9 – 39,8) %, VCM = (55 – 74) fl, Hb = (8,1 – 12,7) g/dl, HCM = (18,9 – 31,4)pg. Se utilizó un instrumento semiautomático para la siembra y separación, en gel de Agarosa, de la fracción A2Hb. El valor porcentual fue hallado por densitometría. De los resultados emergieron dos grupos: A y B. RESULTADOS: Se comparó la variación del RDW con respecto a la A2Hb en los dos grupos, y se comprobó el siguiente comportamiento de los parámetros analizados: Grupo A (n = 71): con el aumento de la fracción A2Hb en un rango de (1,4 – 3,2) %, el RDW disminuyó dentro de un rango comprendido entre (24,0 – 12,3) %, p < 0,05 r² = 0,4516. Grupo B (n = 32): cuando la A2Hb alcanzó valores de Beta Talasemia (3,5 – 5,7) %, el RDW mostró un comportamiento independiente del incremento de la A2Hb p > 0,05 r² = 0,0048, con tendencia a estabilizarse hacia un valor central (14,58 ±0,90). CONCLUSIONES: 1) Se observó que al incrementarse la fracción A2Hb hasta alcanzar un 3,5%, el RDW descendía. 2) Cuando los resultados de la A2Hb fueron compatibles con los de Beta Talasemia (>3,5%), no mostraron relación con el RDW.

62. (3427) OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO MEDIADA POR EL ACTIVADOR TISULAR DEL PLASMINÓGENO (T-PA): ESTIMULADORES SOLUBLES. GAMBA, CECILIA; CASTAÑÓN, MARIA MERCEDES; KORDICH, LUCIA

Depto. Qca. Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

La activación del plasminógeno (Plg) mediada por t-PA en medio plasmático es un proceso ineficiente, mientras que en presencia de fibrina la reacción está potenciada. Objetivo: Seleccionar un estimulador soluble de t-PA que pueda utilizarse en ensayos funcionales amidolíticos de componentes del sistema fibrinolítico. Se prepararon como posibles estimuladores (Est): 1) Monómeros de fibrina por acción de trombina sobre: a) plasma normal diluido (MFp) y b) fibrinógeno (MFf); 2) Productos de degradación por proteólisis plasmínica de: a) fibrinógeno (PDFbg) y b) fibrina obtenida a partir de Fbg y trombina (PDFbn) y 3) Mezcla PDFbn PDFbg (PDF). En éstos se determinó la concentración proteica, el patrón electroforético (SDS-PAGE) y su acción sobre la activación de Plg por t-PA, monitoreando actividad de plasmina (Plm) con el sustrato cromogénico S-2251. Los datos de absorbancia vs. tiempo se ajustaron a una curva sigmoidea,

se obtuvieron los parámetros: tiempo asociado al 50de la reacción ($t_{1/2}$) y estimador de la velocidad de reacción (V) y se definieron dos factores: f ($t_{1/2}$) (cociente entre $t_{1/2}$ Est y $t_{1/2}$ ctrl) y f [V] (cociente entre V[Est] y el V[ctrl]). Se define potenciación = f ($t_{1/2}$) <1, f [V] >1 e inhibición = f ($t_{1/2}$) > 1, f [V] <1. Se indican los f observados promedio \pm error estándar ($n = 3$). Los MFp presentaron un efecto inhibitorio (f [V] $0,56 \pm 0,02$; f ($t_{1/2}$) $1,62 \pm 0,03$) mientras que los MFf no modificaron la reacción estudiada. Los PD presentaron efecto estimulador de t-PA, siendo similar la acción observada con PDFbn (f [V] $1,42 \pm 0,10$; f ($t_{1/2}$) $0,88 \pm 0,03$) y PDF (f [V] $1,30 \pm 0,08$; f ($t_{1/2}$) $0,88 \pm 0,03$) y levemente menor con PDFbg (f [V] $1,42 \pm 0,11$; f ($t_{1/2}$) $1,03 \pm 0,03$). Los PDF no modificaron la acción de Plm pura. Se corroboró el efecto estimulador de los PDF a distintas concentraciones de t-PA. Entre los productos ensayados sólo presentaron efecto estimulador de t-PA los productos de degradación. Como estimulador soluble de t-PA se elige la mezcla PDF.

63. (3458) LA MODALIDAD DE PARTO NO INFLUYE EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL COMO FUENTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS. BREIER, DEBORA VANESA; GAMBA, CECILIA; MARCOS, MARIA ANGELICA; VAN DER VELDE, JUAN; TREVANI, HUGO; DEL POZO, ANA E.

Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan; Hospital Materno Infantil Ramón Sardá

La sangre de cordón umbilical (SCU) ha demostrado ser una fuente adecuada para el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH). El volumen colectado y las células nucleadas totales son parámetros biológicos de importancia para un injerto exitoso. OBJETIVO: Comparar características de los donantes y unidades de SCU colectadas en nuestro banco en relación a la modalidad de parto, vaginal (PV) vs. cesárea (PC), según indicación obstétrica. MÉTODOS: Estudio retrospectivo de 68 familias enroladas en nuestro Banco de SCU (BSCU) relacionado (03/1996 – 07/2003). Las colectas, excepto una, fueron realizadas por personal entrenado, obteniéndose SCU por punción de cordón umbilical antes y después del alumbramiento. Se analizaron: edad materna (EM), Nº de gestación (G), edad gestacional (EG), peso del recién nacido (pRN), sexo del RN (sRN), volumen (Vol) y celularidad total (Ct). Los resultados se expresan como mediana (rango) o media \pm DS. Análisis estadístico: pruebas t Student (t), de la mediana (M) y chi cuadrado (chi). RESULTADOS: Fueron realizadas 60 colectas de SCU. Se excluyen del análisis las 6 primeras (registro incompleto de datos). No fueron realizadas 8 colectas: 4 por fallecimiento del receptor, 2 por abandono y 2 rechazaron la colección.

	EM años n	G n	EG sem. n	pRN g n	sRN M/F n	Vol ml n	Ct x 10(8) n
Parto							
Vaginal	27,6 \pm 5,1 34	3,0 (2-10) 32	38 (36-41) 31	3380 \pm 43 30	17/14 31	111,2 \pm 38,2 35	10,6 \pm 5,5 35
Cesárea	29,9 \pm 6,1 19	3,5 (2-5) 18	39 (34-41) 19	3150 \pm 44 19	14/ 5 19	111,8 \pm 29,3 19	9,2 \pm 3,1 19
	t (NS)	M (NS)	M (p=0,012)	t (NS)	chi (NS)	t (NS)	t (NS)

Las unidades obtenidas por PC no difieren cualitativamente de aquellas obtenidas por PV. No hubo diferencias significativas para las variables analizadas, salvo en edad gestacional que, aunque mayor en el grupo PC, ambas medianas corresponden a embarazos a término.

64. (3472) AGREGABILIDAD Y DEFORMABILIDAD ERITROCITARIA EN RATAS INTOXICADAS CON ALUMINIO (AL). BOLLINI, ADRIANA N; HERNÁNDEZ, GLADIS; BAZZONI, GRACIELA; CONTINI, MARÍA DEL CARMEN; RASIA, MARTA

C. de Biofísica-Fac. de Cs Médicas-UNR

Se ha demostrado que el Al altera las funciones de los glóbulos rojos (GRs), reduciendo su vida media. En este trabajo se estudió el efecto del Al, in vivo, sobre dos propiedades reológicas

eritrocitarias: agregabilidad y deformabilidad. Se trabajó con ratas Wistar machos adultos: controles (sin intoxicar; n:4) e inyectadas con Al(OH)[3] 80 mg/kg PC i.p. 3 veces por semana (n:4). A los 3 meses se les extrajo sangre anticoagulada con EDTA. Se midió: a) viscosidad sanguínea (vs) y plasmática (vp) con viscosímetro cono-plato a 230 s(-1); hematocrito (Hto) por método convencional y con ellos se calculó la viscosidad relativa corregida (vc) a Hto:40% (medida indirecta de la deformabilidad) b) índice de rigidez (IR: a mayor IR, menor deformabilidad) por filtración con membranas micropore y c) agregabilidad en Dextrán 500 al 2%, por método óptico que determina dos parámetros: 2k2n0 (relacionado con la velocidad inicial del proceso) y s0/n0 (con el tamaño de los agregados). Los datos obtenidos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney para grupos no apareados. Se presenta la mediana y su intervalo de confianza (IC 95%) y el grado de significación. a:p<0,05; b: p<0,0001; c:p<0,001; d:p<0,01.

	vc	IR (%)	2k2n0	s0/n0
Ratas controles	4,09(3,75-4,41)	9,13(8,19-10,3)	0,61(0,51-0,71)	1,74(1,72-1,79)
Ratas Intoxicadas con Al	4,42(3,97-4,63)a	>20 b	0,48(0,38-0,53)c	1,68(1,62-1,75)d

Los resultados demuestran que la presencia de Al in vivo produjo una disminución de la deformabilidad (indicada por el aumento de la hc y del IR) y de la agregabilidad eritrocitaria (disminución de ambos parámetros). Este deterioro, atribuible a modificaciones de la membrana eritrocitaria, contribuiría a la reducción de la vida media de los GRs circulantes y la anemia observada en la intoxicación con Al.

65. (3473) EL AUMENTO DE LOS PRECURSORES DE MEGACARIOCITOS (MK) LUEGO DE LA ELIMINACIÓN DE MACRÓFAGOS (M) HEPÁTICOS Y ESPLÉNICOS SE DEBE A UN AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE TROMBOPOYETINA (TPO). LANDONI, VERONICA; VERMEULEN, MONICA; FERNANDEZ, GABRIELA; VAN ROOIJEN, NICO; PALERMO, MARINA; ISTURIZ, MARTIN; ALVES ROSA, FERNANDA

Vrije Universiteit. Amsterdam.

Nosotros demostramos previamente que la eliminación de M utilizando clodronato encapsulado en liposomas (L-C), aumenta el número de precursores de MK en médula ósea (MO) y bazo (B) de ratones BALB/c. En este trabajo evaluamos algunos de los posibles mecanismos involucrados en este efecto. En primer término, estudiamos por citometría de flujo la expresión del receptor para TPO (c-mpl) en células totales de MO y Bazo de ratones tratados con L-C, liposomas vacíos (L-V) o salina (SF), no encontramos modificaciones en este receptor. Por otra parte, se valoró TPO en el suero de los animales tratados. Encontramos un aumento de TPO (pg/ml \pm SEM) en los animales tratados con L-C. En efecto, 12hs: SF: 1731 \pm 107; L-V: 1770 \pm 160,5; L-C: 2704 \pm 494* y 24 hs: SF: 2052 \pm 101,5; L-V: 1998 \pm 96; L-C: 2694 \pm 370*; *p<0,05 vs SF; ANOVA (n=8). No se detectaron cambios a las 48hs. Además, se evaluó la expresión de 3 isoformas (Iso) de mRNA TPO en Hígado, B y Riñón (R) por nested RT-PCR. Los resultados (reacción mRNA TPO: mRNA HPRT x100 \pm SEM) se detallan en la siguiente figura (*p< 0,001, ANOVA, n=3). No se detectaron diferencias en la expresión del mRNA en R.

	Hígado	Hígado	Hígado	Bazo	Bazo	Bazo
Tratamiento	Iso 1	Iso 2	Iso 3	Iso 1	Iso 2	Iso 3
SF	54 \pm 1,7	121 \pm 22	99 \pm 19	0	447 \pm 50	230 \pm 59
L-V	116 \pm 12,7*	195 \pm 28*	204 \pm 32*	129 \pm 3*	333 \pm 49*	318 \pm 20
L-C	163 \pm 18*	240 \pm 6*	220 \pm 12*	68 \pm 7*	183 \pm 14*	298 \pm 25

Estos datos indican que el incremento de la expresión de TPO estaría involucrado en el aumento de precursores de MK. No obstante, no podemos descartar la existencia de otros factores de naturaleza macrofágica involucrados en este proceso.

66. (3506) MÉTODO SIMPLE PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE BENGE JONES. MOTTA, ESTELA; EXILART, HORACIO; ROJAS, AMALIA

H.I.G.A. "Dr. Oscar Allende"

La cuantificación de la proteína de Bence Jones (PBJ) es usada en el diagnóstico y en la evaluación de la respuesta al tratamiento en el Mieloma Múltiple. Objetivo: evaluar un método para la cuantificación de PBJ basado en la electroforesis de las proteínas urinarias sin concentrar. Se estudiaron 7 muestras de orina que presentaban PBJ de pacientes con Mieloma Múltiple. Como método de comparación se eligió un método ampliamente usado en nuestro medio: una alícuota de la orina fue concentrada en AMICON B-15 seguida por electroforesis, coloreada con Rojo Ponceau. La otra parte de la muestra fue utilizada para la cuantificación en orina sin concentrar por electroforesis con coloración de plata. Se determinó densitométricamente el porcentaje de PBJ en las muestras y se calculó su concentración multiplicando el porcentaje de la misma por la proteinuria determinada colorimétricamente con Rojo de Pirogalol. La linealidad del método fue entre 25 mg/l – 400 mg/l. El límite de detección de la técnica fue de 250 ng/banda de proteína. Se observó una buena correlación entre ambos métodos ($p < 0,001$). La ecuación de regresión lineal para la PBJ fue $y = 1,0247 x + 0,0911$ ($r^2 = 0,9768$). Esta técnica se presenta como un método simple, rápido y con baja relación costo beneficio para la cuantificación de PBJ. Además nos sirve para dar una respuesta cuantitativa al seguimiento de los pacientes con proteinuria de Bence Jones.

67. (3607) FAMILIA DE GENES VH DE IGS EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA DE CÉLULAS B (LLC-B). SANJURJO, JULIETA; GAMBERALE, ROMINA; FERNÁNDEZ CALOTTI, PAULA; SÁNCHEZ AVALOS, JULIO; GIOR-DANO, MIRTA

Laboratorio de Inmunología Oncológica, Academia Nacional de Medicina y Hospital de Clínicas, UBA

El repertorio de los genes VH expresados por las células LLC-B difiere del repertorio normal de células B CD5+, lo que sugiere que la Ig de superficie jugaría un papel en el desarrollo leucémico, probablemente a través de la estimulación celular por antígenos o superantígenos. Recientemente se ha reportado una asociación entre algunos genes VH expresados en LLC-B y la localización geográfica de los pacientes, lo que puede atribuirse a diferencias en el background genético o a efectos ambientales regionales. Nuestro objetivo fue analizar el repertorio de genes VH en pacientes LLC-B de nuestro medio. Para ello se determinó la expresión de las familias VH a partir de ARNm obtenido de células leucémicas de sangre periférica utilizando primers específicos de la región líder de cada familia en conjunción con un primer consenso de la región JH. En 7 pacientes se secuenció directamente el producto de PCR comparándose las secuencias con las publicadas en el GeneBank. De los 15 pacientes analizados hasta el momento, 7 pertenecieron a la familia VH3, 4 a la familia VH4, 3 a la familia VH1 y uno a la familia VH7. Con respecto a los que fueron secuenciados, sólo 2 mostraron un porcentaje de mutaciones menores al 3% con respecto a la configuración germinal, lo que los ubica dentro del grupo con peor pronóstico. Cabe destacar que ningún segmento secuenciado coincide con los más frecuentemente representados en el repertorio VH de linfocitos LLC-B reportados en el Hemisferio Norte (VH4-34, VH1-69, VH3-07 y VH3-23), los cuales comprenden en conjunto más del 40% de los casos. Estos resultados, que deben ser confirmados en un número mayor de pacientes, sugieren un uso particular de genes VH en LLC-B en nuestro medio.

68. (3609) EFECTO IN VITRO DE QUERCETINA EXTRAÍDA DE LIGARIA CUNEIFOLIA (QLC) SOBRE LA FORMA, DEFORMABILIDAD Y RESISTENCIA OSMÓTICA ERITROCITARIA. FERRERO, MARIANA; CROSETTI, DIEGO; DOMINIGHINI, ALICIA; ALVAREZ, LUJÁN; RON-

CO, MARÍA TERESA; WAGNER, MARCELO; GURNI, ALBERTO; CARNOVALE, CRISTINA ESTER; LUQUITA, ALEJANDRA

Fac. Cs. Médicas (UNR) Fac. Cs. Bioq. y Farm-UNR. Fac. Farmacia y Bioquímica-UBA. CONICET-CIURN.

Anteriormente demostramos que el tratamiento de ratas con Lc in vivo e in vitro, incrementa la viscosidad sanguínea y disminuye la deformabilidad eritrocitaria. Objetivo: analizar el efecto directo de quercetina extraída de Lc (QLc) 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 QLC concentración 2,3mg % (T) (n=6), incubándose 30 minutos a 37°C. Resultados: Índice de rigidez (IR) (filtración a través de membranas nucleopore): C: $8,79 \pm 1,83$; T: $22,64 \pm 2,98^*$. Forma eritrocitaria (distinción de las formas por microscopía y cálculo del Índice Morfológico IM): C: $-1,88 \pm 0,09$; T: $-2,34 \pm 0,10^*$. Resistencia osmótica (RO) en soluciones de ClNa a distintas osmolaridades calculando $X'[[50]]$ Concentración de ClNa que produce 50 % de hemólisis (mM). Los valores para X [[50]]: C: $0,47 \pm 0,01$ T: $0,42 \pm 0,01^*$. (* $p < 0,05$ vs. C) implicando aumento de RO. Los índices hematimétricos: concentración de hemoglobina corpuscular media (CHbCM -C: $29,35 \pm 0,55$) y volumen corpuscular medio (VCM -C: $71,11 \pm 2,57$) no se modificaron. Conclusión: El efecto de QLC sobre el eritrocito produce un cambio de forma de discocito a esferoestomatocito (IM más negativo). En base a estudios realizados por otros autores, el cambio de forma que observamos estaría indicando una interacción de QLC con la hemicapa interna de la bicapa lipídica de la membrana eritrocitaria. Este cambio explicaría el aumento observado en IR y en RO.

INMUNOLOGÍA II

69. (3372) INTERFERENCIA EN LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL LUMÍNICA EN MEMBRANAS DE ROS POR INMUNOGLOBULINAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS. PAVETO, MARIA CRISTINA; LAVOBSKY, VIVIANA; GÜIDA, MARÍA CATALINA; LEVÍN, MARIANO; MATSUMOTO, SILVIA

INGEBI-CONICET,UBA y Hospital T. Alvarez, Servicio de Neurología

Antecedentes: se ha demostrado en pacientes chagásicos una disociación en la respuesta electrofisiológica fotorreceptora de la retina evocada en condiciones de adaptación a la oscuridad, así como alteraciones en el epitelio pigmentario. Esta alteración es propia de los bastones, en cuya membrana el sistema de transducción de la señal lumínica se compone del fotorreceptor de 7 pasos de membrana rodopsina acoplado a transducina y fosfodiesterasa de GMPc. La rodopsina comparte homología estructural y funcional con otros receptores de membrana acoplados a G, especialmente los β adrenérgicos. Numerosos trabajos demuestran la reacción cruzada de anticuerpos de pacientes chagásicos y monoclonales contra antígenos de Trypanosoma cruzi, con receptores β y muscarínicos. Objetivo: investigar la participación de dichos anticuerpos en la transducción de la señal lumínica en retina. Materiales: el modelo experimental in vitro consiste en membranas de ROS purificadas a partir de retinas de bovino mantenidas en la oscuridad. Métodos: la inhibición por anticuerpos de la actividad de la fosfodiesterasa de GMPc activable por luz blanca, y la detección inmunológica de rodopsina por los mismos anticuerpos en Western blots. La estimulación lumínica de la actividad de fosfodiesterasa en bastones de ROS es inhibida hasta 70-100% por la presencia de IgG purificadas a partir de sueros de pacientes chagásicos con retinopatía comprobada. Controles: suero normal con inhibiciones de 5-20%, y un anticuerpo monoclonal contra el loop extracelular de rodopsina, para la inhibición total. El anticuerpo monoclonal contra la proteína

ribosomal P2β de Tcruzi interfiere significativamente inhibiendo la actividad enzimática 50-80%, inhibición reversible en presencia del péptido que originó el anticuerpo. Western blot: tanto IgG de chagasicos como anticuerpo anti-T.cruzi reaccionan positivamente y específicamente con proteína de membrana de ROS de PM coincidente con la rodopsina.

70. (3377) SOBREENPRESION DE TCR Vβ9 EN LINFOCITOS T CD4+ Y CD8+ DE MUSCULOS CARDIACO Y ESQUELETICO EN RATONES CRONICAMENTE INFECTADOS CON UNA POBLACION MIOTROPICA DE TRYPANOSOMA CRUZI. MINCZ, MARIANA P.; ALBA SOTO, CATALINA; MIRKIN, GERARDO A.

Dto. Microbiología. F. Medicina, U.B.A.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que en la infección crónica por Trypanosoma cruzi, el clonotipo del receptor T Vβ9 (Vβ9) está sobreexpresado en los tejidos inflamados (RT-PCR/Dot-hibridización). En este trabajo evaluamos la expresión de Vβ9 en LT CD4 y LT CD8 de tejidos musculares cardíaco (COR) y esquelético (MES), y bazo (BZ) de ratones infectados con el clon K98, que muestra un marcado tropismo por MES. Células mononucleares aisladas de COR, MES y BZ de ratones C3H/HeN crónicamente infectados se marcaron con Ac monoclonales contra CD4 (FITC), CD8 (FITC) y Vβ9 (biotina/estreptavidina-Cy5-PE). La frecuencia de LT Vβ9+ se determinó mediante citometría de flujo. La asociación entre expresión de Vβ9 en LT CD8 y CD4 de los distintos tejidos se estableció mediante análisis de bloques pareados, mediante la prueba de Chi-cuadrado ($p < 0,05$, $df=1$). La frecuencia de LT CD4 Vβ9+ fue mayor que la de LT CD8 Vβ9+ en COR (15,7% vs 4,2%; $p < 1 \times 10^{-5}$) y BZ (2,3% vs 1,5%; $p < 1 \times 10^{-5}$), pero no en MES (10,9% vs 10,3%; $p=0,168$). Los LT CD8 Vβ9+ predominaron en MES (MES: 10,3% vs COR: 4,2%; $p < 1 \times 10^{-5}$), en tanto que los LT CD4 Vβ9+ predominaron en COR (MES: 10,9% vs COR: 15,7%; $p < 1 \times 10^{-5}$). El predominio de LT CD8 Vβ9+ en MES, tejido altamente parasitado durante el curso de la infección, sugiere que este clonotipo tiene un papel preponderante en el control del parasitismo de MES durante la infección crónica. Su menor frecuencia en COR se explicaría por el menor cardiotropismo del clon K98 de T. cruzi. Por otra parte, la marcada presencia de LT CD4 Vβ9+ en ambos tejidos musculares, sugiere que éstos son responsables de mantener la respuesta inflamatoria durante la fase crónica. Se han iniciado estudios funcionales para determinar la actividad efectora del clonotipo Vβ9 en ambas poblaciones de LT.

71. (3496) LA INFECCIÓN CON TRYPANOSOMA CRUZI INDUCE UN INFILTRADO DE LINFOCITOS T EN PERITONEO QUE SE CORRELACIONA CON UNA INTENSA APOPTOSIS EN LINFOCITOS B. MERINO, CECILIA; MONTES, CAROLINA; ACOSTA-RODRÍGUEZ, EVA; MOTRÁN, CRISTINA; GRUPPI, ADRIANA

Inmunología. Fac Cs Qcas. UNC

La cavidad peritoneal alberga linfocitos (Li) B tanto convencionales como CD5+, los cuales son importantes para el desarrollo y destino final de la infección con T. cruzi. Este trabajo se focalizó en el estudio de LiB, LiT, Macrófagos (Mo) y Neutrófilos (Neu) en la cavidad peritoneal durante el curso de la infección experimental con T. cruzi. Células peritoneales (cPe) de ratones infectados (I) con 500 tripomastigotes de T. cruzi fueron obtenidas en los días 1, 4, 10, y 15 post-infección (pi), usándose como control cPe de ratones normales (N). Mediante citometría de flujo se observó a partir del día 4 pi una disminución en el porcentaje de LiB ($50.13 \pm 5.41\%$ que se hace más marcada en los días 10 y 15 pi (I día 10: $19.72 \pm 0.80\%$ y día 15: $14.03 \pm 3.21\%$ vs N: $68.28 \pm 3.86\%$), con un concomitante aumento de LiT tanto CD4+ como CD8+ (I día 10, CD8: $9.96 \pm 1.32\%$, CD4: $25.73 \pm 5.98\%$, I día 15, CD8: $31.73 \pm 1.88\%$, CD4: $25.69 \pm 0.85\%$, N CD8: $1.11 \pm 0.28\%$, CD4: $9.59 \pm 3.64\%$). No se observaron diferencias significativas en LiT Gamma Delta, Mo ni Neu. Para evaluar si

la reducción de LiB se debe a un incremento en la apoptosis, en el día 10 post-infección se estudió, mediante tinción con Ioduro de Propidio, el porcentaje de células con contenido hipodiploide de DNA luego de 24 hs de cultivo. Se observó que I presentan un mayor porcentaje de Li apoptóticos (I: $24.66 \pm 4.87\%$ vs N: $4.78 \pm 1.97\%$). Particularmente en el compartimento de células CD19+, el porcentaje de células apoptóticas alcanzó un $24.56 \pm 4.17\%$ en I comparado con un $4.58 \pm 2.46\%$ en N. En concordancia, se determinó en I, un mayor porcentaje de LiB que expresan caspasa 3 clivada. Nuestros resultados indican que la infección con T cruzi induce un infiltrado de LiT que podría ser responsable de la apoptosis de LiB. Los datos refuerzan la idea de utilizar el modelo de infección con T. cruzi para estudiar "in vivo" vías efectoras y la consecuencia de la apoptosis de LiB peritoneales.

72. (3600) IL15 E IL18 REGULAN LA ACTIVIDAD NK Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN/ACTIVACIÓN EN LINFOCITOS CD3-CD56+ DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS. DE LA BARRERA, SILVIA; ALEMÁN, MERCEDES; SCHIERLOH, PABLO; BALDINI, MATÍAS²; ALVES, LEANDRO²; ABBATE, EDUARDO²; SASIAIN, MARÍA

IIHema, Academia Nacional de Medicina. División Tisioneumonología, Hospital FJ Muñiz

Es sabido que el IFNg es una citoquina primordial para generar la respuesta adaptativa protectora a micobacterias. La fuente de IFNg temprano que dirigiría la respuesta TH1 podrían ser las células NK. Anteriormente comunicamos que los pacientes con tuberculosis (TB) tienen en sangre periférica un alto % de células CD3-CD56+CD16+ (NK) con una respuesta lítica disminuida que podría deberse a la producción de IL-10 por las APC. En este trabajo evaluamos el papel de citoquinas inductoras de IFNg en NK (IL15, IL18) sobre la actividad lítica y moléculas involucradas en la activación de NK (CD16, CD69, CD11a). PBMC de 7 TB-severos (TBs), 4 TB-moderados (TBm) y 6 N PPD+ se cultivaron 18 hs con Mtb e IL-15 o IL-18, determinándose la lisis NK frente a K562 (40:1) en un ensayo de 4hs. Nuestros resultados demuestran que en N y TB IL15 e IL18 aumentan la actividad lítica basal (sin Mtb, datos no mostrados) e inducida por Mtb: N : Mtb=44+4, + IL15=62+4, + IL18=59+4, ambas $p < 0.05$; TBs: Mtb=18+2, + IL15= 28+2 $p < 0.002$, IL18= 22+2; en TBm: Mtb=30+2, + IL15= 48+2, + IL18= 42+3, ambas $p < 0.02$. Por citometría de flujo, se observó un descenso del % de NK CD69+ en TBs: 29+10 ($p < 0.05$), TBm 69+11, N, 69+9, y de MFI de CD69 y CD16. IL15 e IL18 aumentaron el % de CD69+, CD57+ y CD11a+ en TBs. La depleción de monocitos incrementó la respuesta lítica inducida por IL-18 y en menor grado por IL15, así como el % de CD69+ inducido por IL18. Nuestros resultados sugieren que una asociación entre la respuesta lítica y la expresión de moléculas de adhesión/activación en células NK de TB. Esta respuesta es modulada por IL-15 o IL-18, inductores de IFNg, durante la activación antigénica y regulado por monocitos en TBs posiblemente a través del antagonismo entre IFNg e IL-10.

73. (3611) LA APOPTOSIS DE NEUTRÓFILOS (PMN) INDUCIDA POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (MTB) EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS ES MEDIADA POR TLR2. SCHIERLOH, PABLO; ALEMÁN, MERCEDES; DE LA BARRERA, SILVIA; MUSELLA, ROSA²; SAAB, MARÍA²; ABBATE, EDUARDO²; SASIAIN, MARÍA

IIHema, Academia Nacional de Medicina ²División Tisioneumonología, Hospital FJ Muñiz

Anteriormente demostramos que el estado de activación de PMN circulantes en pacientes con TB (TB-PMN) induce in vitro un aumento de la apoptosis espontánea. Inicialmente el Mycobacterium tuberculosis (Mtb) retrasa la apoptosis pero luego incrementa el proceso apoptótico in vitro en TB-PMN. El proceso ocurriría mediante la interacción de la bacteria entera sin mediar fagocitosis, no involucraría al CD11b y dicha activación

involucra la vía de p38 MAPK. En este trabajo determinamos los receptores que podrían estar involucrados en el reconocimiento del Mtb y activación de p38 MAPK. Para ello, se bloquearon en PMN los receptores, CD14, CD16, CD32, CD64 y TLR2 previo al agregado o no de Mtb. Posteriormente se cultivaron 18 hs, determinándose apoptosis por ensayo de unión a AnexinaV-FITC-PI (%AV+). Los resultados obtenidos muestran que en TB-PMN (n=8) y no en PMN de Normales (N) (n=8), la apoptosis inducida y no la espontánea, es inhibida por anti-TLR2 (media \pm SEM de PMN % AV+): TB-PMN=52 \pm 5, anti-TLR2=32 \pm 5 p<0.05; N-PMN: 35 \pm 2, anti-TLR2=32 \pm 2, observamos además una mayor expresión de TLR2 en TB-PMN (evaluado como %MFI de N, p<0.02, n= 8), dicha expresión de TLR2 no disminuye a lo largo del cultivo en TB-PMN, pero sí en N-PMN. Nuestros resultados sugieren que en PMN de pacientes con tuberculosis, la apoptosis inducida por Mtb ocurre vía TLR2 y no involucra a CD14,CD16,CD32 ni CD64, sin embargo no podemos descartar que otros TLR también estén involucrados.

74. (3613) EXPRESIÓN DE CD1 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON LEPRO. RIVERO, ALEJANDRA; FINK, SUSANA; ILARREGUI, JUAN; OLIVARES, LILIANA²; PIZZARIELLO, GRACIELA²; SASIAIN, MARIA; FINIASZ, MARTA

IIHema, Academia Nac. de Medicina ² Servicio de Dermatología, Hospital Muñiz.

Las moléculas CD1 permiten el reconocimiento de antígenos lipídicos y glucolipídicos, mecanismo importante para generar una respuesta inmune protectora en las infecciones por micobacterias. Se determinó la expresión de las proteínas CD1 (CD1a, b y c) en células de sangre periférica recientemente aisladas (día 0) de 18 pacientes con lepra (15 multibacilares, MB, y 3 paucibacilares, PB) y de 14 individuos normales (N), y de 5 pacientes y 3 N cultivadas 5 días con GMCSF e IL-4 (CKs) con y sin agregado de *Mycobacterium leprae* (Mlep) durante las últimas 18 hs de cultivo. Se obtuvieron células mononucleares por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque, se marcaron con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos y se analizó la región de monocitos en un citómetro de flujo FACScan. Los resultados se expresan como índice de intensidad de fluorescencia media (IFM)= (IFM experimental-IFM isotipo)/ IFM isotipo: día 0: CD1a: MB: 0,93 \pm 0,16; PB: 0,19 \pm 0,06; N: 0,52 \pm 0,18; CD1b: MB: 0,44 \pm 0,18; PB: 0,91 \pm 0,60; N: 0,19 \pm 0,09; CD1c: MB: 0,89 \pm 0,24; PB: 0,53 \pm 0,06; N: 0,79 \pm 0,18. No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD1a, b, c en las células recientemente aisladas de los pacientes respecto de las de los controles N. En presencia de CKs se observaron altos niveles de expresión de CD1 que disminuyeron significativamente con el agregado de Mlep en células de pacientes y de controles N. La distribución de las moléculas CD1 en células de sangre periférica no se modificaría como consecuencia de la enfermedad. La exposición al Mlep no induciría una maduración de las células presentadoras de antígeno.

75. (3618) ACTIVACIÓN POR LA VÍA CLÁSICA Y PRODUCCIÓN DE IL-12 POR MACRÓFAGOS ESPLÉNICOS DE UNA CEPA DE RATÓN RESISTENTE A LA INFECCIÓN POR TRYPANOSOMA CRUZI Y A LA AUTOINMUNIDAD CARDÍACA. GUIÑAZÚ, NATALIA; PELLEGRINI, ANDREA; AOKI, MARIA DEL PILAR; GEA, SUSANA

Fac. Ciencias Químicas. U.N.C.

Previamente reportamos que macrófagos esplénicos (MÆ) de ratones BALB/c susceptibles a la infección, inmunizados con cruzipaina (Cz), presentan una elevada actividad de la enzima arginasa. Siendo los MÆ las principales células involucradas en el control o diseminación del parásito, el objetivo de este trabajo fue evaluar las vías de activación alternativa -arginasa- y clásica - óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS)-, en MÆ provenientes de ratones C57BL/6, resistentes a la infección, inmunizados con Cz. También se analizaron las citoquinas IL-12, predominante

de la vía clásica e IL-10. Ratones C57BL/6 de 8 semanas fueron inmunizados cada 14 días con 3 dosis i.d de 10 ug de Cz (Inmune, n=12) o 10 ug de ovalbumina (Control, n=12) más CFA. Los MÆ inmunes produjeron altos niveles de nitritos al ser estimulados con Cz o con LPS/IFNg- estimulante de iNOS (p=0,008 y p=0,02 respectivamente). Las células controles solo produjeron óxido nítrico en presencia de LPS/IFNg (p=0,001). Se observó una regulación positiva de iNOS en los lisados celulares de MÆ inmunes estimulados con Cz o LPS/IFNg por western blot. Por el contrario, la activación de la enzima arginasa fue detectable en bajos niveles en MÆ inmunes estimulados con Cz. Estimulantes de arginasa, LPS o IL-4, incrementaron los niveles de urea, producto de la arginasa (p<0,05) y la arginasa I fue regulada positivamente. Al ensayar las citoquinas IL-12 e IL-10 en sobrenadantes de MÆ inmunes estimulados con Cz, se detectó un aumento de IL-12 (p< 0,001) mientras que los niveles de IL-10 no mostraron diferencias respecto de los basales estimulados con medio. En conclusión, la inmunización de ratones C57BL/6 con Cz induce la producción de IL-12 y la activación de MÆ esplénicos principalmente por la vía clásica, la cual es facilitada por altos niveles de IFNg previamente demostrados en este modelo experimental.

76. (3953) CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS EN BOVINOS INFECTADOS CON MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS. COLAVECCHIA, SILVIA; MUNDO, SILVIA

Inmunología, Fac. Cs. Vet. UBA

La paratuberculosis es una enfermedad infecciosa producida por *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (Mp), que afecta a los rumiantes. En los últimos estadios las Igs antimycobacterium se incrementan en el suero. En estas infecciones, se cree que la inmunidad humoral es prácticamente nula. Pero, se han encontrado anticuerpos (Acs) protectores dirigidos contra LAM de *M. tuberculosis*. El lipoarabinomano (LAM) es el componente glicolipídico que se encuentra en mayor proporción en la pared celular de micobacterias. En este trabajo se estudió la respuesta de Acs de tipo IgG1 e IgG2 de animales infectados frente a Mp (bacteria entera), LAM y PPA (extracto citoplasmático proteico). Se extrajo LAM de cultivo de Mp, y se caracterizó por SDS-PAGE y Western blot. Se evaluó la presencia de Acs específicos por ELISA frente a Mp, LAM y PPA de 10 bovinos infectados. Se utilizaron Acs anti-isotipos bovinos (anti-IgG1 y anti-IgG2). Se inoculó un bovino con LAM de Mp para su comparación con sueros de animales infectados. Se consideraron positivos aquellos sueros que dieron una absorbancia mayor de la media más 3 desvíos estándar. Se analizaron utilizando el test de Student. Los resultados se detallan en la siguiente tabla: Se muestra la media +/- desvío estándar y el número de positivos frente al total de animales evaluados.

	IgG1Media+/-ds	IgG2Media+/-ds
MP	0.85+/-0.091 (9/10)	0.63+/-0.05 (9/10)
PPA	0.49+/-0.058 (10/10)	0.23+/-0.07 (2/10)
LAM	0.65+/-0.06 (10/10)	0.41+/-0.07 (7/10)

En la infección se producen Acs frente a las diferentes fracciones de la micobacteria de isotipo IgG1 en forma predominante solo en el caso de antígenos proteicos. Cuando se evalúan antígenos de tipo LAM o bacterias enteras (lípidos en su mayoría) no se observa predominio de ningún isotipo de IgG.

77. (4003) EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN TEMPRANA CON AGENTES DEL ORDEN ACTINOMICETALES SOBRE LA INFECCIÓN AGUDA EXPERIMENTAL CON TRYPANOSOMA CRUZI EN RATAS. FONTANELLA, GERMÁN H¹; VINUESA, MIGUEL A²; NOCITO, ANA LÍA³; REVELLI, SILVIA¹; BOTTASSO, OSCAR¹

Instituto de Inmunología. Facultad de Ciencias Médicas U.N. Rosario. ¹Instituto de Inmunología; ²Cátedras de

²Histología y ³A.Patológica. Fac. Cs. Médicas. U.N. Rosario.

La respuesta inmune en la etapa temprana de la vida parece ser inadecuada para las infecciones con patógenos intracelulares, pudiendo a su vez modularse por microorganismos medio-ambientales. En base a ello, se estudió si la inmunización con agentes saprófitos del orden Actinomycetales (*Rhodococcus coprophilus* -Rc-, *Gordona bronchialis* -Gb- o *Tsukamurella inchenensis* -Ti-) modificaba el curso de la infección experimental con *T. cruzi* en ratas (10(6) tripomastigotes cepa Tulahuén, 21 días de edad). Las crías se inocularon con 10(7) Rc, Gb, o Ti (muertos por calor) o solución fisiológica (SF) al nacimiento, 14 y 28 días de vida. Los primeros estudios se focalizaron en el período agudo (30 días) analizando repercusión sistémica (parasitemias y mortalidad) y miocarditis. Muestras de miocardio tomadas a los 7, 14 y 21 días post-infección (pi) se procesaron con técnicas convencionales (hematoxilina-eosina) e inmunohistoquímicas para la marcación de células CD4+ y CD8+. Los grupos Rc, Gb, Ti mostraron menores niveles de parasitemias pico, sin mortalidades en los 4 grupos. No se evidenciaron nidos de amastigotes pero sí focos inflamatorios linfomononucleares autorresolutivos en todos los grupos (diferencias no significativas). El número de células CD4+ y CD8+ fue mayor en los tres grupos tratados respecto del SF con diferencias significativas entre éste último y los 3 primeros para el fenotipo CD8+ ($p < 0.05$, día 14 pi). En el caso de las células CD4+ la diferencia con SF fue más visible para el grupo Gb ($p < 0.05$). Si bien el contacto precoz con agentes favorecedores de una mejor respuesta celular parece condicionar una infección atenuada, los cambios inmunohistológicos del miocardio plantean una posterior evaluación durante la fase crónica.

78. (4015) ALTERACIONES TÍMICAS EN RATONES KOS EN LOS RECEPTORES DE FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (FNT-ALFA) EN UN MODELO DE CHAGAS AGUDO EXPERIMENTAL. PÉREZ, ANA ROSA; NICORA, A; PALAZZI, J; BESEDOVSKY, H; DEL REY, A; ROGGERO, E; BOTTASSO, O

Inst de Estudios Bioquímicos, Rosario. Inst de Fisiología Normal y Pat. Univ Philipps, Alemania.

Estudios previos mostraron que durante la infección aguda con *T. cruzi* (Tc) en ratones C57BL/6 se produce una marcada atrofia tímica y apoptosis en corteza con elevados niveles circulantes de FNTalfa, el cual mediaría en parte dicho fenómeno. Para profundizar en torno de esta hipótesis se infectaron ratones KOs en los receptores p55 y p75 del FNTalfa con 100Tc Tulahuén ($n=4-5$ /grupo). La mortalidad fue del 100% en los ratones controles (B6) y en ambos KOs, mientras que el tiempo de sobrevida disminuyó marcadamente en éstos últimos ($p < 0.05$ vs B6). También se estudió a distintos días post-infección (pi): parasitemia (Ps), niveles circulantes de FNTalfa por ELISA y corticosterona (CT) por RIA. Los resultados obtenidos al día 15pi fueron (media±es): Ps (Tc/50campos) B6=197±9, p55(-/-)=718±101 ($p < 0.008$ vs B6), p75(-/-)=336±44 ($p < 0.032$ vs B6); FNTalfa (ng/ml) B6=0.58±0.09, p55(-/-)=2.99±0.45 ($p < 0.028$ vs B6), p75(-/-)=1.08±0.1 ($p < 0.014$ vs B6); CT(aumento relativo D15pi/D0) B6=2.54±0.3, p55(-/-)=9.75±1.53 ($p < 0.014$ vs B6), p75(-/-)=5.17±1.4 ($p < 0.014$ vs B6). La involución tímica, estimada mediante la pérdida relativa de peso (prp=peso timo/peso ratón-D15pi) fue mayor en ambas cepas KOs respecto a B6 estando exacerbada en p55(-/-): B6=209±33, p55(-/-)=50±4.2 ($p < 0.014$ vs B6), p75(-/-)=108±13 ($p < 0.014$ vs B6). Resultados similares se hallaron al evaluar el aumento relativo en el nivel de apoptosis tímica (p55(-/-) vs B6 $p < 0.05$). El mayor incremento en los niveles de FNTalfa y CT que se observó en la cepa p55(-/-) se vinculó a una mayor involución y apoptosis tímica, sugerente de que ambos mediadores participarían en la misma. Las alteraciones en la cepa p75(-/-) fueron similares a las halladas en p5(-/-) pero de menor magnitud.

79. (4023) ESTUDIO DE LA APOPTOSIS Y EXPORTACIÓN TÍMICA DURANTE LA INFECCIÓN CHAGÁSICA AGUDA

EN RATONES C57BL/6. PÉREZ, ANA ROSA; NICORA, A; PALAZZI, J; BESEDOVSKY, H; DEL REY, A; ROGGERO, E; BOTTASSO, O

Instituto de Inmunología, Fac. de Cs. Médicas, UNR Inst de Estudios Bioquímicos, Rosario. Inst. de Fisiología Normal y Pat, Univ. Philipps, Alemania.

La infección aguda experimental con *T. cruzi* (Tc) en ratones C57BL/6 produce una severa depleción de timocitos con apoptosis en corteza, acompañada por una marcada hiperplasia en bazo (B) y ganglios linfáticos (GL). Nuestro objetivo fue estudiar como los fenómenos de exportación y apoptosis influyen en la atrofia tímica observada en este modelo experimental, a distintos días post-infección (pi). Primero se evaluó la exportación del timo a B y GL mediante la inoculación intratímica de FITC. La exportación tímica fue estimada como el % de células FITC+ en el órgano periférico x peso del órgano/ % de células FITC+ en timo, a las 24 hs de la inoculación intratímica. Se observó un aumento progresivo en la exportación a B y GL con una posterior disminución al día 17 pi (media±es, $n=5-7$ /grupo); B: D0=1.73±0.65, D7pi=5.1±1.2 (vs D0 $p < 0.018$), D14=63±15.5 (vs D0 $p < 0.001$), D17pi=31±5 (vs D0 $p < 0.018$); GL: D0=0.58±0.34, D7pi=1.16±0.23 (vs D0 ns), D14pi=20.2±6.8 (vs D0 $p < 0.01$), D17pi=4.5±0.5 (vs D0 $p < 0.018$). En segundo lugar se analizaron las distintas subpoblaciones tímicas y el % de apoptosis en los timocitos (media±es, 4-5/grupo); CD4+CD8+ (%): D0=82±3.4, D7pi=58.2±4.5 (vs D0 $p < 0.05$), D14pi=46.3±11 (vs D0 $p < 0.05$), D17pi=29.8±8.8 (vs D0 $p < 0.014$); apoptosis (%): D0=6.5±1.5, D7pi=8.1±2.5 (vs D0 ns), D14 pi=12±2.5 (vs D0 $p < 0.05$), D17pi=21.8±5.3 (vs D0 $p < 0.014$). Posteriormente se analizaron los niveles de Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNT) por ELISA y corticosterona (CT) por RIA (media±es, $n=4-6$ /grupo); FNT (pg/ml): D0=0, D17pi=421±188 (vs D0 $p < 0.002$); CT (µg/dl): D0=0.56±0.12, D17pi=15±5 (vs D0 $p < 0.014$). La atrofia tímica durante la infección aguda con Tc se correlaciona con un marcado aumento en la apoptosis y exportación tímica, asociada a un aumento en los niveles de FNT y CT.

80. (4035) REGULACIÓN DE PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS POR LA MOLÉCULA COESTIMULADORA INDUCIBLE (ICOS) EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS ACTIVA.

MARTINEZ, GUSTAVO; PASQUINELLI, VIRGINIA; QUIROGA, FLORENCIA; CASTRO ZORRILLA, LILIANA; MUSELLA, ROSA; GARCIA, VERONICA

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA Instituto de Tisiología, Htal Muñiz.

La respuesta efectiva contra infecciones intracelulares como las producidas por micobacterias requiere respuestas Th1. La molécula coestimuladora inducible (ICOS) puede regular los niveles/patrones de citoquinas producidos por células T: la señalización vía ICOS no sólo promueve la producción de IL-10 e IL-4, sino que influye en respuestas Th1 y Th2 durante la fase efectora de la activación. Investigamos la función de ICOS durante la tuberculosis (TBC) humana en una población con dos grupos de pacientes: alta respuesta (AR) y baja respuesta (BR) a *Mycobacterium tuberculosis* (según proliferación y producción de IFN- γ). La señalización vía ICOS en células de pacientes estimuladas con antígeno (Ag) en presencia de concentraciones subóptimas de anti-CD3 aumentó significativamente la producción de IFN- γ en AR ($p < 0.05$) y produjo un menor pero significativo incremento ($p < 0.05$) en BR. Sin embargo, los niveles de IL-10 e IL-4 no variaron al estimular vía ICOS. Resultados similares fueron obtenidos al estimular vía ICOS en ausencia de anti-CD3. En dadores sanos (DS), la señalización vía ICOS en células cultivadas con Ag y concentraciones subóptimas de anti-CD3 también aumentó significativamente el IFN- γ . Interesantemente, la señalización vía ICOS (en ausencia de Ag) indujo un marcado aumento de IL-10 en DS. Asimismo, M. tuberculosis indujo expresión proteica de ICOS en AR pero no en pacientes BR. Nuestros datos muestran que la señalización vía ICOS incrementa IL-10 en DS pero no en pacientes con TBC, mien-

tras que en células estimuladas con Ag la coestimulación vía ICOS incrementa IFN- γ tanto en pacientes como en DS. Estos resultados señalan a ICOS como blanco potencial para modulación terapéutica en TBC, aumentando respuestas Th1 en pacientes con infecciones por micobacterias.

INMUNOLOGÍA III

81. (3411) ES LA ESTABILIDAD PROTEICA UN FACTOR DETERMINANTE EN EL DESENCADENAMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE? MATHOV, IRINA; SANTOS, JAVIER; VELIKOVSKY, ALEJANDRO; ERMÁCORA, MARIO; FOSSATI, CARLOS A.

Cátedra de Inmunología, FFyB, UBA Dpto de Ciencia y Tecnología, UNQ

La β lactamasa de *Bacillus licheniformis* (EXOs) es una proteína de exportación sumamente resistente a la proteólisis in vitro, ya sea frente a tripsina como a proteinasa K. Sus variantes truncadas en 9 (D9) o 19 (D19) aminoácidos del extremo amino-terminal, en cambio, son más sensibles a la proteólisis que la proteína nativa (EXOs < D9 < D19). Con el propósito de determinar la relación entre estabilidad proteica e inmunogenicidad, se inocularon lotes de ratones Balb/c repetidamente por vía ip con 10 μ g de EXOs o con sus variantes truncadas D9 y D19, en ausencia de adyuvantes. Se observó, mediante ELISA indirecto, que los ratones inmunizados con EXOs no desarrollaron una buena respuesta humoral frente al antígeno luego de tres dosis de antígeno (suero diluido 1/100, OD=0.0363 \pm 0.028), mientras que los ratones inmunizados con las variantes truncadas fueron capaces de montar respuesta humoral (para suero diluido 1/100, OD D9=0.223 \pm 0.014; OD D19=2.159 \pm 0.135). En cambio, cuando la inmunización se realizó con EXOs en presencia de adyuvante de Freund, los ratones montaron una buena respuesta humoral (una dosis, OD= 1.800 \pm 0.631). Los ratones inmunizados con EXOs respondieron frente a dos dosis de D19 (50 μ g) con un bajo nivel de anticuerpos, semejante al de una primoinmunización. Ensayos preliminares de proliferación celular indicaron que los esplenocitos de los ratones inmunizados con estos antígenos incorporan timidina tritiada al ser estimulados con D9, pero no al ser estimulados con EXOs. Tomando a la EXOs y sus variantes truncadas como modelo, podemos concluir que una proteína resistente a la proteólisis no será capaz de inducir una respuesta inmune, mientras que esto sí ocurrirá si la misma proteína se encuentra total o parcialmente desplegada. Esto puede tener una consecuencia directa en el diseño de proteínas recombinantes utilizadas en vacunación.

82. (3438) EFECTO DE AGENTES DESNATURALIZANTES Y REDUCTORES SOBRE LA CUANTIFICACIÓN INMUNOCUÍMICA DE GLIADINAS. DOÑA, VANINA; FOSSATI, CARLOS ALBERTO; CHIRDO, FERNANDO GABRIEL

Cátedra de Inmunología, FFyB, UBA

La Enfermedad Celíaca es una intolerancia a un grupo de proteínas de trigo (gliadinas), cebada y centeno. Su tratamiento consiste en una ingesta de alimentos libres de dichas proteínas y certificados por métodos de ELISA con alto poder de detección. Para incrementar la recuperación de las proteínas del alimento se ha propuesto el uso de agentes reductores (2-Mercaptoetanol, 2ME) y desnaturalizantes (clorhidrato de guanidinio, G). Nuestro objetivo fue analizar si el uso de estos agentes interfiere en la interacción antígeno/anticuerpo y conduce a un error en la cuantificación. El efecto de estos agentes se estudió sobre el antígeno, el anticuerpo y su interacción. Se observó una fuerte interferencia sobre la unión de los anticuerpos poli y monoclonales específicos en ELISA indirecto, siendo el efecto del 2ME más importante que el del G. En ELISA competitivo, el 2ME produjo sobre- o subestimación dependiendo de la concentración de gliadinas. Mientras que en ELISA de captura siempre se subes-

timó. En ambos formatos de ensayo, se observó interferencia a concentraciones de 2ME mayores de 0.001% y de G de 0.01M. La desnaturalización del antígeno provocada por 2ME en la fase de extracción impide el reconocimiento por cualquiera de los anticuerpos usados. En conclusión, si bien se logra un incremento en la recuperación de proteínas de la matriz del alimento, el uso 2ME y G conduce a una grave interferencia en la cuantificación de gliadinas, cuya magnitud y sentido depende de numerosos factores (concentración de gliadina, anticuerpo y tipo de ELISA, y naturaleza y concentración de los aditivos). Por la complejidad del sistema en estudio, ésta interferencia genera un serio problema analítico cuyas consecuencias pueden extrapolarse a otros sistemas de detección inmunocuímica.

83. (3693) COLECISTECTOMÍA POR VIDEOLAPAROSCOPIA: REPERCUSIONES SOBRE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS Y SISTÉMICOS. GRAZIOLA, ENZO; DE LORENZO, SILVANA; COLUCCI, DARÍO; MÉNDEZ, FERNANDA; ELENA, GUSTAVO; PUIG, NORA R.

Hospital Italiano Garibaldi. Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR

La cirugía laparoscópica ha sido aceptada en base a la experiencia clínica. Los pacientes se benefician con una recuperación más rápida, menor dolor y rápido retorno a sus actividades normales. El presente estudio evalúa los cambios inmunológicos y sistémicos que se suceden en colecistectomías por videolaparoscopia (CVL). Se incluyeron pacientes entre 20-65 años (n=16), estado físico ASA I, en los que se realizó CVL a las 7:30 por la técnica estándar de 4 trócares. La anestesia administrada fue propofol, fentanil e isoflurano. En muestras de sangre: basal, intraoperatoria (IO), 2 horas después del final de la cirugía (2hPO), 1er y 7º día postoperatorio (PO), se realizó hemograma, recuento leucocitario y linfocitario (CD3, CD4, CD8, CD16-CD56 y CD20), se evaluó el metabolismo oxidativo de células fagocíticas -por citometría de flujo- y se determinó el nivel sérico de cortisol, nitritos, interleucina 6 y proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, C3 y C4). Las evaluaciones estadísticas se analizaron por tests no paramétricos. Se verificaron aumentos significativos (p<0.05) con respecto a los valores basales en las siguientes variables. En el IO en cortisol, nitritos, índice oxidativo de los neutrófilos y nivel de células CD16-CD56, mientras que 2hPO aumentaron los leucocitos, neutrófilos y las células mononucleares estimadas por PMA. La IL-6, proteínas de fase aguda y neutrófilos estuvieron elevados en el 1er día PO, así como los linfocitos CD3, CD4, CD8 y CD20, mientras que para el día 7 sólo se mantenían elevados C3 y C4. A pesar de que la cirugía laparoscópica es mínimamente invasiva, se activa la respuesta inmune sistémica. Dichas alteraciones son, no obstante, de menor jerarquía que las descritas para la cirugía por laparotomía.

84. (3748) EFECTO DE LA FIBRONECTINA SOBRE LA GENOTOXICIDAD DEL CLORURO MERCÚRICO. PEREZ, GERMÁN; SALVARREY, MARCELA; SABALL, ESTER

Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

El Cloruro mercúrico es un inductor de autoinmunidad experimental, particularmente glomerulonefritis, en líneas de ratas y ratones susceptibles. Tiene además actividad genotóxica. Previamente demostramos que la Fibronectina (Fn), proteína plasmática y de la matriz extracelular, previene parcialmente del daño renal en ratas inyectadas con HgCl₂[2]. El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de Fn sobre la genotoxicidad del HgCl₂[2] en células mononucleares de sangre periférica humana (CMH). Para ello se aislaron las células por gradiente de Ficoll-Hypaque y se las incubó 1 hora a 37°C con: 1) HgCl₂[2] (7 μ M); 2) HgCl₂[2] (7 μ M) + Fn (200 μ M) y los respectivos controles con 3) PBS y 4) Fn. El daño en el DNA se determinó empleando el Ensayo Cometa Alcalino. Este consiste en resuspender las células en agarosa

0.75% dejando solidificar sobre una superficie, lisarlas, desnaturar el DNA en medio alcalino (pH>13) y someterlas a electroforesis en el mismo medio. El DNA fragmentado sale del núcleo y migra al ánodo. Una vez teñido se observa con la forma característica que da nombre al ensayo. Se realizaron 3 experimentos independientes por duplicado. Aplicando el programa CASP (Comet Assay Software Project) se analizaron 100 imágenes/grupo y se calcularon los momentos de la cola, TM (% DNA cola x longitud cola) en los distintos grupos. La comparación se realizó aplicando la técnica de comparaciones múltiples basada en la suma de rangos de Kruskal-Wallis, que se procesó con el programa BMDP, resultando TM del grupo 1 significativamente mayor que TM de 2, 3 y 4 ($p=1.7E-7$); 1) media 13.85, mediana 8.74, Rango intercuartil (RI) 13.03; 2) media 1.75, mediana 0.73, RI 1.77; 3) media 3.92, mediana 0.05, RI 0.95; 4) media 1.52, mediana 0.03, RI 0.76. Los resultados muestran que el Cloruro mercúrico ejerce un efecto genotóxico sobre CMH y que la coincubación con Fn disminuye dicho efecto llevándolo a los valores control sin Mercurio, lo cual sugiere un rol protector para esta proteína.

85. (3775) ESTUDIOS PRELIMINARES DE LAS CARACTERÍSTICAS INMUNOLÓGICAS DE LAS IGS DE CAMELIDOS SUDAMERICANOS. DE SIMONE, EMILIO; SACCODOSSI, NATALIA; FERRARI, ALEJANDRO; GONZALEZ MAGLIO, DANIEL; LEONI, JULIANA

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

En 1993 Hamers-Casterman y col. describen por primera vez en dromedarios (*Camelus dromedarius*) la existencia de Inmunoglobulinas formadas únicamente por cadenas pesadas, siendo las mismas de clase IgG (IgG[HH]). Actualmente se conocen por lo menos 3 isotipos de IgG (IgG[1], IgG[2] e IgG[3]), de los cuales la IgG[2] e IgG[3] son de tipo IgG[HH] y la IgG[1] mantiene la estructura convencional (IgG[H2L2]). Las IgG[HH] no contienen dominio CH[1] a pesar de que el mismo se encuentra presente en el genoma, además presentan una serie de sustituciones importantes en la cadena pesada que le confieren solubilidad en solventes salinos. Estudios posteriores demostraron que también las llamas (*Lama glama*) presentan una fracción de Igs del tipo IgG[HH]. El objetivo del presente trabajo fue purificar las diferentes subclases de IgG en Camélidos Sudamericanos, inclusive en guanacos y vicuñas (*Lama guanicoe* y *Vicugna vicugna*), ya que hasta el presente no existían datos que indicaran la presencia de IgG[HH] en estos animales. Además buscamos estudiar diferentes características inmunológicas de los isotipos purificados. Los Igs se purificaron aprovechando la diferente afinidad que poseen por Proteína A y Proteína G. Los isotipos purificados fueron analizados por SDS-Page 12%. Posteriormente se probó la capacidad de fijar el complemento de cada isotipo mediante el uso de suero de Llama inmunizado con p18 de *Brucella sp.* (Gentilmente cedida por el Dr. F. Goldbaum). Se logró purificar los diferentes isotipos de IgG en Camélidos Sudamericanos, sorprendentemente se observó que la IgM presenta afinidad por Proteína G. Las pruebas de fijación de Complemento demostraron que el isotipo IgG[1] y el suero total fijan Complemento. Mientras que con los isotipos de IgG[2] e IgG[3], se observó la presencia de poder anticomplementario probablemente debido a la agregación que sufrirían a causa del método de purificación utilizado (baja molaridad y pH).

86. (3803) CLONADO, EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASAS LEUCOCITARIO HUMANO (ISPL). MAFFIA, PAULO¹; TATEOSIAN, NANCY¹; ANTON, ERICA²; CHULUYAN, EDUARDO¹

Inmunogenética, Hosp. Clínicas (UBA) ²Laboratorio Lepp, Universidad Nacional de Quilmes

El ISPL es una proteína no glicosilada de 11,7 KDa expresada en mucosas y epitelio, con una función relevante en el man-

tenimiento del balance proteasas-antiproteasas. El objetivo del trabajo fue la obtención de esta proteína recombinante en forma soluble a través de un solo paso de purificación por afinidad y su caracterización in vivo e in vitro. El gen correspondiente al péptido maduro del ISPL se amplificó a partir de ARNm de una línea celular y fue clonado en un vector de expresión (pET22b+) agregándole 6 His C-terminal. Se examinaron varias cepas de *E. coli* en su capacidad de expresión de ISPL seleccionándose la cepa BL21 CodonPlus(DAE) RIL (con expresión inducible y codones mutados para genes eucariotas). La purificación se llevó a cabo con una resina de Niquel-agarosa. La actividad de la proteína recombinante fue evaluada y corroborada realizando ensayos de inhibición de tripsina utilizando un sustrato cromogénico. Dado que el ISPL es un policatión el siguiente paso fue evaluar la actividad enzimática de la proteína agregándole un polianión como el ADN genómico. El agregado de ADN a la solución de ISPL resultó en aumento significativo de la actividad inhibitoria de tripsina (>25% $p<0.001$). Además, la actividad anti-inflamatoria del rhSLPI fue examinada en ratones en un modelo de inflamación aguda que evalúa el reclutamiento de leucocitos. El tratamiento de los ratones con rhISLP demostró una disminución de la migración de leucocitos en aproximadamente un 20 % comparado con los controles. La metodología de clonado y purificación utilizada en este trabajo nos permitió obtener una proteína recombinante humana soluble y activa. Por otro lado, el aumento de la actividad inhibitoria de la proteína en presencia de ADN nos sugiere una estabilización de la unión tripsina-ISPL. En función de los experimentos in vivo, es posible concluir que ISPL humano puede ser utilizado en modelos murinos.

87. (3879) DETERMINACIÓN DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASA LEUCOCITARIA (ISPL) EN LA SECRECIÓN SALIVAL: PRESENCIA DE UN RITMO CIRCADIANO. TATEOSIAN, NANCY; MAFFIA, PAULO; SCUBLINSKY, DARIO; CHULUYAN, EDUARDO

Inmunogenética, Hosp. Clínicas. UBA

El ISPL es un inhibidor de serino proteasas, aislada inicialmente de secreciones salivales de parótida humana. Además de evitar el daño proteolítico, el ISPL tiene actividad anti-inflamatoria, interfiere en la captación de LPS e inhibe la invasión de monocitos por el virus del HIV. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de variación circadianas en la secreción salival de ISPL en humanos. La saliva total de 28 voluntarios sanos (18-35 años) fue recogida a las 08:00, 12:00, 20:00 y 24:00 h. Las muestras fueron analizadas mediante ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y determinación de proteínas totales con ácido bicinconínico (BCA). Los niveles de ISPL fueron significativamente menores a las 08:00 hs (551 ± 77 ng/ml) comparado con las muestras obtenidas a las 24:00 hs (1122 ± 250; $p < 0.01$), pero no a las 12:00 (704 ± 144) o a las 20:00 hs (983 ± 290). Por otro lado no hubo diferencias significativas en el contenido de proteínas totales salivales en ninguna de las horas examinadas. Sin embargo, la normalización de los niveles de ISPL en función de las proteínas totales permitió evidenciar diferencias significativas mayores entre las 08:00 (5,1 ± 1,3) y las 24:00 hs (9,4 ± 1,9 $p < 0.004$) y entre las 08:00 y las 20:00 hs (7,8 ± 1,6; $p < 0.04$), sugiriendo que la producción de ISPL disminuye a lo largo del día. A pesar de las diferencias halladas en la concentración salival de ISPL, no se pudo observar correlación con la actividad proteolítica salival total medido en un ensayo cromogénico que mide la proteólisis del péptido N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide. Estos resultados demuestran variaciones salivales diarias de ISPL, sugiriendo que la producción salival de la proteína esta bajo el control del sistema nervioso autónomo.

88. (3881) CÉLULAS EPITELIALES DE PRÓSTATA SON SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN IN VITRO POR CHLAMYDIA TRACHOMATIS. MACKERN OBERTI*, JUAN PABLO; CUFFINI**, CECILIA; GATTI*, GERARDO; MOTRICH*, RU-BÉN DARÍO; MACCIONI*, MARIANA; RIVERO*, VIRGINIA ELENA

Dep. de Bioq. Clínica, Fac. de Cs. Qcas., UNC *Dep. de Bioq. Clínica, Fac. de Cs. Qcas.; * Instituto de Virología, Fac. de Cs. Médicas, UNC

La bacteria intracelular obligada *Chlamydia trachomatis* se ha postulada como agente causal de un importante número de casos de prostatitis crónica infecciosa. A pesar de que se conoce que *Chlamydia trachomatis* es capaz de infectar in vitro células epiteliales (CE) del tracto genital femenino como CE endocervicales, poco se conoce acerca de la infección de CE del tracto genital masculino y más precisamente CE de próstata por este patógeno. El objetivo de este trabajo fue estudiar la susceptibilidad de CE de próstata de rata de la línea JHU-4 a la infección por la cepa *Chlamydia muridarum* (mouse pneumonitis biovar de *Chlamydia trachomatis*). Para ello se infectaron in vitro células JHU-4 con distintas dosis UFI (unidades formadoras de inclusión) de *Chlamydia muridarum*. Inmunofluorescencias realizadas con anticuerpos monoclonales contra LPS-*Chlamydia* revelaron presencia de cuerpos de inclusión 72 hs post infección. Los niveles de nitritos encontrados en sobrenadantes a las 72 hs de cultivo fueron 24.15 ± 2.79 mM y 3.01 ± 0.80 mM para CE infectadas (dosis 15 UFI/cel) y no infectadas respectivamente ($p < 0.05$). Los niveles de nitritos presentes en los sobrenadantes fueron dependientes de la dosis de *Chlamydia muridarum* utilizada para infectar, con valores de 4.70, 8.93 y 24.15 mM para dosis de 0.15, 1.5 y 15 UFI/cel respectivamente. Se observó además un aumento en la intensidad de fluorescencia para los antígenos MHC clase I e ICAM (Canal Medio de Fluorescencia (CMF): 44.68 y 71.94) en células infectadas cuando se las comparó con células sin infectar (CMF: 29.02 y 28.64 respectivamente). Estos resultados nos permiten afirmar que CE de próstata son susceptibles a la infección por *Chlamydia muridarum* y que la misma induce cambios funcionales y fenotípicos en esta población celular.

89. (3925) INCREMENTO EN LA EXPORTACIÓN TÍMICA EN RATONES MUTANTES PARA L-CATEPSINA. LOMBARDI, GABRIELA; BURZYN, DALIA; COSTA, HÉCTOR; MUNDIÑANO, JULIANA; PASQUALINI, CHRISTIANE DOSNE; PIAZZON, ISABEL; NEPOMNASCHY, IRENE

ILEX-Conicet, Div. Medicina Experimental, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina

Los ratones *nack* poseen una delección en el gen para L-catepsina. Estos mutantes presentan una deficiencia en la selección positiva de células CD4+ y en consecuencia el número de linfocitos T (LT) CD4+ está disminuido. Evaluamos la capacidad de estos ratones para exportar LT CD4+ a la periferia. Se inoculó FITC en ambos lóbulos tímicos de ratones mutantes y hermanos normales, considerándose emigrantes tímicos recientes (RTE) a las células FITC+ recuperadas en la periferia a las 16hs (Le Campion A et al, J Immunol 2002,168:1664). El número de timocitos CD4+ exportados diariamente a la periferia fue de $(10.3 \pm 2.5) \times 10^4$ en n/n vs $(24.0 \pm 8.9) \times 10^4$ en n/+ ($p < 0.001$) (media \pm DS, n=8). Sin embargo, la relación de RTE/CD4+/timocitos CD4+, resultó significativamente mayor en los mutantes: 0.053 ± 0.019 vs 0.017 ± 0.011 ($p < 0.01$) (media \pm DS, n=7). Anteriormente habíamos descripto que para las LT CD8+ tanto la exportación tímica como la relación RTE/timocitos CD8+ estaban significativamente aumentadas en estos mutantes. Cuando se determinó el nivel de exportación tímica de LT, se observó que el número de RTE totales encontrados en los órganos linfoides periféricos de ratones mutantes no presentaba diferencias significativas con el normal: $(3.0 \pm 0.6) \times 10^5$ vs $(3.0 \pm 0.7) \times 10^5$ (media \pm DS, n=7). Sin embargo, la exportación tímica total calculada como la relación de RTE totales/timocitos SP totales fue mayor en los mutantes: 0.140 ± 0.078 vs 0.034 ± 0.017 ($p < 0.0001$) (media \pm DS, n=10). Los resultados indican un aumento en la exportación tímica de LT totales y de LT CD4+ en los ratones *nack*, independientemente de su deficiencia en la selección positiva de células CD4+. Hipotetizamos que la catepsina L podría interactuar con componentes de la matriz extracelular tímica que intervienen en la migración de los timocitos.

90. (3942) CLONADO, EXPRESIÓN E INTERACCIÓN DE CADENAS VARIABLES β HUMANAS DE RECEPTORES DE LINFOCITOS T (TCRS) Y EL SUPERANTÍGENO BACTERIANO SSA. DE MARZI, MAURICIO M.*; FENÁNDEZ, MARISA M.*; GANEM, BERNARDA*; MOLINERO, LUCIANA‡; ZWIRNER, NORBERTO L.‡; LLERA, ANDREA S.‡; MALCHIODI, EMILIO L.*

Cat. de Inmunología-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA-IDEHU-CONICET Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas y Fundación Instituto Leloir.

Los superantígenos (SAGs) son proteínas inmunoestimuladoras de origen bacteriano o viral causantes de diversas enfermedades. Actúan por activación de un gran porcentaje de linfocitos T (hasta un 20%), interactuando con el dominio variable β ($V\beta$) de los TCRs y con las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II. Con el objetivo de estudiar la interacción entre estas moléculas construimos diferentes cadenas β de TCRs con los dominios humanos $V\beta 5.2$, $V\beta 1$ y $V\beta 2.1$. Estas fueron expresadas como cuerpos de inclusión, replegadas y purificadas. Por otro lado el SAG de *Streptococcus pyogenes* SSA-1 fue clonado y expresado como proteína soluble periplásmica. SSA-1 esta compuesto por una forma dimerica debido a un puente disulfuro intermolecular, y por una forma monomérica que no pudo ser completamente aislada del dimer. Un mutante denominado SSAC26S fue producido para eliminar la Cys responsable de la dimerización. Demostramos la actividad estimuladora de los SAGs recombinantes en ensayos de proliferación y estos resultados sugieren que la dimerización ocluiría el sitio de interacción con el TCR. Los ensayos de afinidad se realizaron empleando un Biosensor de espejo resonante (IASys). Se demostró que SAA-1 monomero y su mutante tienen una muy rápida kon que no fue posible calcular utilizando el programa FAST PLOT. Por el contrario la koff es moderadamente rápida permitiendo su calculo. Ambos SAGs tienen alta afinidad por $V\beta 5.2$ y $V\beta 1$ y sus KD, obtenidas por Scatchard, varían entre 5 y 9 μ M. En contraste con otros autores, no detectamos interacción entre $V\beta 2.1$ y SSA-1.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN I

91. (3539) HEMORREOLOGÍA Y MICROANGIOPATÍA DIABÉTICA. D'ARRIGO, MABEL; CARRERA, LARISA; FORESTO, PATRICIA; RAUL, ETCHPARE; D'OTTAVIO, ALBERTO; VALVERDE, JUANA; RASIA, RODOLFO

Fac. de Cs. Bioq. y Farm. U.N.R. Depto. de Bioq. Clínica. Fac. de Cs. Médicas. Hosp. Provincial Rosario

La Diabetes Mellitus puede afectar diversos parámetros hemorreológicos. Con el fin de analizar si estos podrían influir en la patogenia de la microangiopatía diabética se determinó en un grupo de 56 pacientes diabéticos 18 con y 38 sin lesiones cutáneas atribuidas a la microangiopatía diabética, la viscosidad sanguínea (VS) a diferentes velocidades de corte (4.60 y 230 seg⁻¹) y la viscosidad plasmática (VP) a 2,30 seg⁻¹, con un viscosímetro cono-plato; la agregación eritrocitaria a través del análisis de la morfología de los agregados (ASP) y la fibrinogenemia mediante el método de Clauss. Se compararon ambos grupos con 20 controles sanos. Para el estudio estadístico se utilizó el test de Kruskal-Wallis que mostró diferencias significativas entre los valores de viscosidad sanguínea a bajas velocidades (4.60 seg⁻¹) ($p = 0,004$) entre los grupos y de la viscosidad plasmática ($p=0,008$). No hubo diferencias significativas a 230 seg⁻¹ ($p = 0,476$). La fibrinogenemia y la agregación también mostraron diferencias significativas ($p = 0,0003$ y $p = 0,002$). Resultados en promedio \pm desvío estándar: Controles: VS4.60seg⁻¹ 5.97 ± 2.01 ; VS230seg⁻¹ 3.74 ± 0.48 ; VP2.30seg⁻¹ 4.23 ± 1.53 ; ASP 0.28 ± 0.13 ; Fibrinógeno 207 ± 26 ; Diabét. c/lesión: VS4.60seg⁻¹ 8.76 ± 3.98 ; VS230seg⁻¹ 3.61 ± 0.87 ; VP2.30seg⁻¹ 8.12 ± 5.47 ; ASP 0.67 ± 0.16 ; Fibrinógeno 346 ± 87 ; Diabét. s/lesión: VS4.60seg⁻¹ 11.94 ± 6.50 ; VS230seg⁻¹ 4.31 ± 1.26 ; VP2.30seg⁻¹ 13.14 ± 12.3 ;

ASP 0.65 ± 0.11 ; Fibrinógeno 361 ± 65 . Los elevados valores hallados en los diferentes parámetros hemorreológicos de pacientes diabéticos sin lesiones demuestran que dicha alteración antecedería a la aparición de las lesiones cutáneas atribuidas a la microangiopatía diabética y que estos parámetros podrían contribuir a su desarrollo.

92. (3766) IMPACTO METABÓLICO DE LA SOBREENPRESIÓN DE GLUCOSA-6-FOSFATASA (G6PASA) Y FRUCTOSA-1,6-BIFOSFATASA (FBPASA) EN CULTIVO DE HEPATOCITOS: EVALUACIÓN DEL CONTROL DE LA SÍNTESIS DE GLUCOSA Y DE GLUCÓGENO. FAVRE, CRISTIÁN; MARÍN, SILVIA; CASCANTE, MARTA; GUINOVART, JOAN

Instituto de Fisiología Experimental. Fac. Bioquímica. UNR Ingeniería Metabólica y Terapia de la Diabetes, Parque Científico de Barcelona-Univ. de Barcelona

La producción hepática de glucosa y la contribución en su regulación, tanto de la gluconeogénesis como de la síntesis y degradación de glucógeno, son temas de interés por su implicancia en la etiología de la diabetes. FBPasa y G6Pasa catalizan las últimas reacciones irreversibles de la gluconeogénesis en el hepatocito. Ambas se han descrito aumentadas en diabetes de tipo I y II. **OBJETIVO:** Analizar el impacto de la sobreexpresión de G6Pasa y FBPasa en hepatocitos en presencia de sustratos gluconeogénicos, con el fin de conocer el control que ejercen en distintas vías metabólicas. **MÉTODOS:** Se utilizó cultivo primario de hepatocitos de rata sin infectar, o infectados con un rango apropiado de títulos de adenovirus recombinantes conteniendo el cDNA de G6Pasa (AdCMV-G6Pasa) o FBPasa (AdCMV-FBPasa); depletados de glucógeno 16 h y reincubados 3 h en presencia de glucosa o glicerol. Se determinaron G6Pasa y FBPasa (proteína y actividad), los niveles celulares de glucosa-6P y glucógeno, y los de glucosa y lactato del medio. **RESULTADOS:** La glucosa aumentó en las células AdCMV-FBPasa tras su depleción de glucógeno (ayunadas), siendo para una actividad FBPasa de 2 veces la basal (2n) de 1.1 vs. 0.6 mM de la media en el grupo ayunado sin infectar ($p < 0.05$). Se evidenció una fuerza de control de magnitud similar de la G6Pasa en la producción de glucosa, pero a partir de glicerol. El contenido de glucógeno aumentó con AdCMV-FBPasa y disminuyó con AdCMV-G6Pasa, respecto a los controles. Para FBPasa 2n, el aumento fue mayor con glucosa como sustrato (9 ± 2 vs. 5 ± 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína); para G6Pasa la mayor disminución se obtuvo con glicerol (5 ± 1 vs. 11 ± 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) ($p < 0.05$). G6Pasa y FBPasa tendrían diferente fuerza de control sobre la síntesis de glucosa y la de glucógeno, así como preponderancia en distintas situaciones metabólicas. Este tipo de análisis es útil para que emerjan posibles blancos de terapias farmacológicas.

93. (3795) CRECIMIENTO ESQUELÉTICO APENDICULAR EN UN MODELO ANIMAL DE INGESTA SUBOPTIMA. COMPAGNUCCI, C; COMPAGNUCCI, G; MANDALUNIS, P; ROIG, M; ELVERDIN, J; BOYER, P

Cátedras de Fisiología e Histología y Embriología, FOUBA

La restricción energética leve y crónica resulta en un enanismo por desnutrición (ED), con un retraso puberal asociado al deterioro del crecimiento corporal en humanos. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de la restricción global leve y crónica sobre el crecimiento esquelético apendicular y la repercusión sobre las variables histomorfológicas óseas en un modelo animal de ED. 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). Determinaciones: 1) Peso (P) y Longitud (L) corporales. 2) En suero: GH, IGF-I, testosterona (T) (RIA) y leptina (Lp) (ELISA). 3) En tibia: a) Peso (p) y longitud (l); b) Ancho del cartílago epifisario (Ac), c) Ancho del cartílago en reposo y en proliferación (Ap), d) An-

cho del cartílago hipertrófico (Ah), e) % de Volumen óseo (%Vo). Resultados de ED vs C a T4 ($x \pm ES$): 1) P y L disminuyeron significativamente ($p < 0.001$). 2) GH (ng/ml): 7.13 ± 0.96 vs 21.6 ± 5.02 ($p < 0.05$); IGF-I (ng/ml): 529.4 ± 51.8 vs 1503.0 ± 60.5 ($p < 0.001$); T (ng/ml): < 0.1 vs 0.34 ± 0.04 ($p < 0.01$); Lp (ng/ml): 0.79 ± 0.23 vs 1.61 ± 0.23 ($p < 0.05$). 3) a) p y l disminuyeron significativamente ($p < 0.001$); b) Ac (mm): 322.74 ± 9.92 vs 415.30 ± 17.0 ($p < 0.01$); c) Ap (mm): 225.96 ± 5.70 vs 280.71 ± 12.52 ($p < 0.01$); d) Ah (mm): 95.16 ± 5.81 vs 134.65 ± 9.29 ($p < 0.01$); e) %Vo: 17.64 ± 3.26 vs 26.77 ± 2.03 ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que las alteraciones histomorfológicas óseas y el consecuente deterioro en el crecimiento longitudinal observado en el ED, podría ser el resultado de alteraciones neuroendócrinas secundarias al estrés nutricional con una posible disminución de la IGF-I producida localmente en el cartílago epifisario.

94. (3824) CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE ALA Y HEMINA EN TRYPANOSOMA CRUZI. CICCARELLI, ALEJANDRA; ARAUJO, LIDIA; LOMBARDO, ELISA; BATLLE, ALCIRA

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, CONICET - FCEN (UBA)

Trypanosoma cruzi posee un camino biosintético del hemo parcialmente deficiente. Para su crecimiento in vitro es necesario suplementar el medio con compuestos hémicos. Nuestro objetivo fue correlacionar los niveles de hemina agregada con la cantidad de ácido 5-aminolevulínico (ALA) sintetizado por el parásito. Como no disponíamos de un método para la medición de hemina en el medio de cultivo nuestro trabajo comenzó poniendo a punto un ensayo para realizar dichas mediciones utilizando la banda espectral S⁻ que las metaloporfirinas presentan entre 360-380 nm. Optimizando la extracción de la hemina en cloroformo acidificado, registrando la absorbancia a 450, 388 y 330 nm y empleando la fórmula $Ac = 2 \cdot A_{380} - (A_{450} + A_{330})$ se observó una buena correlación lineal entre Ac y la concentración de hemina ($1.15-9.20$ mM) aún en presencia de proteínas (0.06 ± 5.00 mg/ml) y porfirinas (protoporfirina IX 0.19 ± 2.97 mM). Comparando con el método del piridin hemocromógeno nuestro ensayo fue mucho más reproducible, 15 a 30 veces más sensible y permitió cuantificar concentraciones 4 veces menores de hemina. Al correlacionar los niveles de hemina en el medio con el ALA formado observamos que: 1) sólo un 2% de ALA permanece dentro de la célula, el resto se excreta; 2) el ALA excretado disminuye al aumentar los niveles de hemina (27.85 ± 4.03 y 6.42 ± 0.99 nmoles ALA/ml medio se correlacionan con 0.33 ± 0.23 y 4.55 ± 1.46 mg hemina/ml) mientras que el intracelular permanece constante; 3) al aumentar los niveles de hemina ($4.60 - 15.00$ mg/ml) disminuye la cantidad de ALA ($55.80 \pm 0.82 - 42.12 \pm 0.72$ nmoles/ml) y aumenta un 30 - 50% el poder inhibitorio del sobrenadante de T. cruzi sobre el ALA - S. Nuestros resultados avalarían la regulación feedback del hemo sobre la síntesis de ALA.

95. (3847) EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ZINC SOBRE ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH EN EPIDÍMIO DE RATA. GOMEZ, NIDIA NOEMÍ; FERNANDEZ, MARIA ROSA; ZIRULNIK, FANNY; MOLINA, ALICIA; PEREZ CHACA, VERONICA; GIMENEZ, MARÍA SOFÍA

Universidad Nacional de San Luis Laboratorio de Química Biológica, Fac. de Qca, Bca y Farmacia, UNSL

El Zinc es un oligoelemento esencial para el equilibrio metabólico celular. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que el estrés oxidativo producido por la deficiencia en Zinc incrementa los niveles de los TBAR's y reduce la capacidad de defensa antioxidante por parte de glutatión peroxidasa y catalasa. El objetivo de este trabajo es estudiar la actividad de enzimas productoras de NADPH, necesario para mantener los equivalentes de reducción del sistema GSH- GSSG, importante en la defensa antioxidante no enzimática y evaluar los niveles de oxidación proteica midiendo

carbonilos en epidídimo de rata. Ratas Wistar (200- 250g) mantenidas en jaulas individuales se separaron en 2 grupos: Control (Co) alimentadas con la dieta AIM-93 conteniendo 30 mg Zn/kg y Deficiente en Zinc (DZ) alimentadas con la misma dieta sin Zinc. Después de 2 meses de tratamiento los animales fueron sacrificados y removidos los epidídimos, separándose cabeza y cola de los mismos. La actividad de las enzimas dependientes de NADP: isocitrato deshidrogenasa (ICD), glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) y málico deshidro-genasa (MD) fueron determinadas según Farrell (1980), Kornberg (1953) y Ochoa (1968) y los carbonilos por Levine (1990). Comparando los resultados obtenidos se observa que no hay diferencias significativas en ICD y MD, en G6PD se observa un incremento en cola de DZ. Cuando determinamos los carbonilos proteicos, estos aumentan significativamente ($p < 0.01$) en las colas de epidídimos deficientes comparados con los controles. Los resultados obtenidos sugieren que el estrés oxidativo producido por la deficiencia de Zinc en este modelo experimental alteraría la actividad de G6PD, verificándose una considerable oxidación proteica.

96. (3863) EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ZINC EN PARÁMETROS BRONCOALVEOLARES. GOMEZ, NIDIA NOEMÍ; BIAGGIO, VERONICA; GIMENEZ, MARÍA SOFÍA

Universidad Nacional de San Luis Laboratorio de Química Biológica, Fac. de Qca. Bca y Farmacia, UNSL

Son limitadas las investigaciones que han estudiado los cambios del surfactante pulmonar con elementos trazas. El Zinc un oligoelemento esencial para el equilibrio metabólico y su deficiencia produce alteraciones órgano específicas. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar indicadores de injuria en lavados broncoalveolares (BAL) y la composición de los distintos subtipos de surfactante en relación con las alteraciones del parénquima pulmonar (Gomez et al.) producto de la deficiencia crónica de zinc. Se utilizaron ratas Wistar macho de 200 ± 20 g de peso, que recibieron por 2 meses una dieta AIM-93 (Reeves et al). Los animales se separaron en dos lotes: Grupo Control (Co) con un contenido de Zn de 30 mg/Kg de dieta y un lote con una dieta deficiente de Zinc (ZD). A los 2 meses se anestesiaron los animales y se hicieron los lavados con solución salina 0.9% (10 x 5 ml). Las células se obtuvieron por centrifugación a 500g, de los BAL que se fijaron y colorearon para su análisis y diferenciación. Las proteínas totales se midieron por Lowry et al., lactato deshidrogenasa (LDH) según Amador et al., nitritos por el método de Griess. Los subtipos de surfactante se separaron por centrifugación diferencial a 40000g/30 min y a partir de los pellets y sobrenadantes obtenidos se determino fósforo (Rouser et al.). Los resultados fueron Proteínas (mg/ml): Co 0.79 ± 0.05 ZD 1.3 ± 0.03 ($p < 0.05$), LDH (U/L): Co 13 ± 1.0 ZD 17 ± 1.5 ($p < 0.05$), Nitritos (μ M): Co 15.1 ± 4.2 ZD 31.6 ± 7.5 ($p < 0.05$). No se observaron cambios en la proporción de los subtipos liviano y pesado de surfactante, pero los ZD presentaron una neutrofilia y linfocitosis importante en BAL ($p < 0.01$). En los lavados broncoalveolares de ratas deficientes de zinc se observan alteraciones como: cambios en la permeabilidad celular, producción de nitritos, incremento de polimorfonucleares que estarían reflejando el daño pulmonar.

97. (3901) SUPLEMENTACIÓN NUTRICIONAL CON ÁCIDO ASCÓRBICO. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE PARCIAL PLASMÁTICA MEDIANTE EPR. CORRELACIÓN CON ELECTROFORESIS CAPILAR. PIEHL, LIDIA; FACORRO, GRACIELA; HUARTE, MÓNICA; DESIMONE, MARTÍN; COPELLO, GUILLERMO; RUBIN DE CELIS, EMILIO

Cátedra de Física y LANAIS - RLBM - Facultad Farmacia y Bioquímica - UBA - Cátedra de Química Analítica Instrumental Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA.

La disminución por la acción de antioxidantes de la intensidad de la señal de Resonancia Paramagnética Electrónica de los radicales nitróxido ha sido usada para el estudio de capacidades antioxidantes. El plasma sanguíneo contiene sustancias con poder antioxidante, tales como ácido ascórbico (AA), glutatión, áci-

do úrico, alfa-tocoferol, otros grupos tioles, etc. El AA es el antioxidante hidrosoluble más importante, siendo su concentración dependiente de la dieta. El objetivo del presente trabajo es evaluar la Capacidad Antioxidante Parcial Plasmática (CAPP) usando el radical nitróxido TEMPO y su detección por EPR (TEMPO-EPR) en individuos normales, antes y durante el suplemento de 1g/día de AA en su dieta y relacionarla con el contenido plasmático de AA, determinado mediante electroforesis capilar (EC). Las CAPP expresadas en concentraciones equivalentes de AA fueron, basal: 88 ± 30 microM (+/- s, n=26), con ingesta: 130 ± 20 microM (+/- s, n=20). Estudios de neutralización del TEMPO con los principales antioxidantes hidrosolubles presentes en el plasma mostraron una marcada reactividad con AA, despreciable con albúmina y ausencia de reacción con glutatión y ácido úrico en el tiempo de estudio. Las CAAP obtenidas mostraron buena correlación con las concentraciones de AA determinadas por EC. Concluimos que las CAPP determinadas mediante TEMPO-EPR representan en su mayor parte el contenido de AA en las muestras. Este método presenta la ventaja de ser rápido, simple y de no requerir desproteinización de la muestra, necesaria en la determinación química, por HPLC y por EC, hecho que puede conducir a pérdida y/o oxidación del AA presente. Asimismo, sugerimos que la metodología propuesta puede ser utilizada para evaluar la capacidad antioxidante plasmática debida al AA.

98. (3921) DETERMINACION DE DEPOSITOS DE GB3 EN ORINA Y MUCOSA CONJUNTIVAL EN PACIENTES DE UNA FAMILIA CON ENFERMEDAD DE FABRY. ROZENFELD, PAULA; EBNER, ROBERTO; CROXATO, OSCAR; FERNANDEZ, SEGUNDO; FOSSATI, CARLOS

Cátedra de Inmunología, Fac.Cs Exactas, UNLP Hospital Británico, Capital Federal Fundación Oftalmológica Argentina C.I.P.E.R.C.A. SRL.

La enfermedad de Fabry es un desorden genético recesivo ligado al cromosoma X, debido a la deficiencia de la actividad de la enzima lisosomal alfa-galactosidasa-A, que conduce a la acumulación de globotriaosilceramida (Gb3) en diversos tejidos, como riñón y ojo. Dado que el principal órgano afectado es el riñón, se realiza comúnmente una biopsia renal como complemento del diagnóstico enzimático. Analizamos una familia de 300 miembros, donde se halló actividad disminuida en 6 miembros. A uno de ellos se le realizó la biopsia renal, encontrándose cuerpos lamelares. El objetivo de este trabajo es determinar Gb3 en sedimento urinario y en biopsias de mucosa conjuntival, en los miembros de dicha familia. Se realizó el análisis en 4 varones sintomáticos y 2 mujeres asintomáticas, con actividad de alfa-galactosidasa disminuida. Además se incluyó a otra mujer de la misma familia, que refiere síntomas de la enfermedad pero con actividad enzimática normal. Se detectó la presencia de Gb3 en sedimento urinario, mediante cromatografía en capa fina, en los 6 miembros con actividad enzimática reducida. La biopsia de mucosa conjuntival, observada con microscopía óptica y electrónica muestra la presencia de cuerpos lamelares, que corresponderían a depósitos de Gb3, tanto en los pacientes con actividad enzimática reducida como en aquella sintomática pero con actividad normal. En conclusión, la biopsia de conjuntiva ocular muestra los depósitos de Gb3 característicos de la enfermedad. Además fue capaz de detectarlos en una mujer sintomática, con actividad enzimática normal y sin presencia de Gb3 en sedimento urinario. Esta biopsia es mucho más sencilla, práctica, y no requiere internación, a diferencia de la biopsia renal que se practica comúnmente como diagnóstico de esta patología.

99. (3977) MECANISMO DE TOXICIDAD CELULAR: ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO (HCB) SOBRE CÉLULAS EN CULTIVO. ROSSI, LUCAS; MILLER, ELIANA; GUERRA, LILIANA N.; RÍOS DE MOLINA, MARÍA C.

Dpto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

En trabajos previos hemos demostrado que el antioxidante tiocetamida inhibe la acción porfirinogénica del HCB en ratas. Actualmente estudiamos los mecanismos involucrados a nivel celular. Trabajamos con una línea de hepatocitos en medio de cultivo sólo o adicionado con HCB 0,5 ó 1 µM. Los cultivos se mantuvieron 24 ó 48 hs. en estufa a 37°C. Sobre las células, previamente lavadas, se midieron proteínas oxidadas, por cuantificación de grupos carbonilos, y grado de peroxidación lipídica, por medición de TBARS (sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico). Como posibles defensas antioxidantes se determinaron las actividades superóxido dismutasa (SOD) y catalasa. Los resultados indicaron que, a las 24 hs. de tratamiento con HCB 0,5 ó 1 µM, se produce un aumento de 1,7 ó 3,7 veces respectivamente ($p < 0,05$) en el contenido de TBARS respecto del control ($2,91 \pm 0,04$ nmoles/mg prot.). El aumento se mantuvo a las 48 hs. La concentración de carbonilos de determinó sobre cultivos control de células Hep2 y células MDCK (de riñón) (6,4 y 1,2 nmoles carbonilos/mg de proteína) y sobre las mismas tratadas con HCB 1 µM, encontrando aumentos de 2 y 7 veces respectivamente ($p < 0,05$). La actividad de las enzimas antioxidante también aumentó como efecto del tóxico, aunque con cinéticas distintas. La SOD sólo aumentó a la mayor dosis ensayada (1,6 veces) desde las 24 hs de tratamiento, decayendo ligeramente a las 48 hs. (control: $4,70 \pm 0,40$ U/mg prot.). En tanto que la catalasa presentó un aumento en función del tiempo ensayado, que pasó de 1,3 veces a las 24 hs. a 3,5 veces a las 48 hs., independientemente de la concentración de HCB aplicada. Los resultados indican que el HCB, si bien activa las defensas enzimáticas antioxidantes, provoca estrés oxidativo en el hepatocito (y posiblemente en otros tipos celulares), desencadenando oxidación de macromoléculas.

NEUROCIENCIAS I

- 100. (3235) LATERALIDAD DEL NÚCLEO ACCUMBENS Y LA AMÍGDALA BASO-LATERAL EN LA MODULACIÓN DE LA CONDUCTA EXPLORATORIA INDUCIDA POR LA NOVEDAD "CONFLICTIVA" EN LA RATA: PAPEL DE LA HISTAMINA.** ALVAREZ, EDGARDO O.; BANZAN, ARTURO M.

UNEFECO, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

Se conoce que numerosas estructuras cerebrales que existen en ambos hemisferios ofrecen el fenómeno de la "lateralidad", es decir especialización funcional para las tareas que realiza la estructura. En este trabajo se estudió la posibilidad de una modulación diferencial del núcleo Accumbens (ACC) y la amígdala basolateral (ABL) en la expresión de la conducta exploratoria desarrollada en un ambiente conflictivo. Se trabajó con un total de 113 ratas dispuestas en 2 grupos (hemisferio derecho y hemisferio izquierdo) las que se implantaron con una cánula de microinyección en el ACC y la ABL de cada lado. Todos los subgrupos de animales ($11 = n = 20$) se estimularon químicamente con solución salina, 9, 45 o 90 nmol de histamina. Cinco min después se estudiaron por 5 min en un laberinto en cruz elevado asimétrico. Los resultados mostraron que en el brazo más atemorizante ("Sin Pared), la estimulación por histamina en el hemisferio derecho provocó una inhibición dosis-dependiente del score de exploración ($3,5 \pm 3,1$ seg, dosis 45 nmol; $0 \pm 1,8$ seg, dosis 90 nmol Vs $11,1 \pm 2,8$ seg, salino); en cambio para el mismo brazo en el hemisferio izquierdo, el tratamiento con histamina no modificó la exploración. Una situación inversa se observó en el brazo menos atemorizante ("Alto Alto"), donde la estimulación histaminérgica del lado izquierdo inhibió la exploración a las dosis de 45 y 90 nmol; mientras que las mismas dosis fueron inefectivas en el lado derecho. Los datos sugieren existencia de lateralidad funcional histaminérgica en los núcleos ACC y ABL en la rata.

- 101. (3243) LA ACTIVACIÓN DE LAS NEURONAS HISTAMINA-SENSIBLES DEL HIPOCAMPO INTERFIERE CON EL PROCESO DE CONSOLIDACIÓN DE UNA RESPUESTA**

DE EVITACIÓN CONDICIONADA. ALVAREZ, EDGARDO O.; BANZAN, ARTURO M.

UNCuyo UNEFCO, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

Evidencias previas de este laboratorio han mostrado el papel inhibitorio de los receptores histaminérgicos del hipocampo de la rata en la evocación de una respuesta de evitación condicionada. El objetivo del presente trabajo fue investigar si estas neuronas histamina-sensibles hipocámpales interfieren también con la consolidación de la memoria. Se implantaron un total de 90 ratas machos con cánulas de microinyección en el hipocampo ventral, dispuestas en 2 grupos: "Tiempo 0" ($n=48$) y "Tiempo 15" ($n=42$). Todos los grupos se sometieron a 2 sesiones de entrenamiento de 8 ensayos cada una, donde los animales retuvieron la respuesta de evitación a un golpe eléctrico anticipado por un tono de ultrasonido. En un caso, inmediatamente después del último ensayo ("Tiempo 0"), subgrupos de animales fueron microinyectados con salina, 9, 45 y 90 nmol de histamina. En el otro caso, 15 min después del último ensayo ("Tiempo 15"), idénticos subgrupos fueron microinyectados de la misma forma. Veinte y cuatro horas después, en una tercera sesión, se evaluó la consolidación de la memoria. Los resultados mostraron que la latencia de escape en el Grupo "0 min" se prolongó significativamente hasta el ensayo 3 ($27 \pm 3,8$ s Vs $4,5 \pm 2,8$ s, $p < 0,01$; histamina 9 Vs salina) y la eficiencia de aprendizaje alcanzó el 50% en el ensayo 6 ($50 \pm 7,6\%$ Vs $83,3 \pm 5,9\%$, $p < 0,01$; histamina 9 Vs salina). A pesar que en el Grupo "15 min", la histamina afectó menos la latencia de escape, la eficiencia de aprendizaje estuvo de todas maneras significativamente disminuida. Los datos sugieren que la histamina en el hipocampo afecta también la consolidación de la memoria.

- 102. (3244) INFLUENCIA DE LA CONFIGURACIÓN GEOMÉTRICA DE OBJETOS NOVEDOSOS EN LA DISCRIMINACIÓN EXPLORATORIA EN AMBIENTES NO-CONFLICTIVOS EN LA RATA.** ALVAREZ, EDGARDO O.; ALVAREZ, PABLO A.

UNCuyo UNEFCO, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

Se conoce que la exploración inducida por la novedad en la rata depende del estímulo "novedoso" del medio ambiente. En el presente trabajo, se trató de relacionar las características intrínsecas del objeto con el grado de exploración del animal en un intento por evaluar los mecanismos centrales de la motivación exploratoria. Como objetos novedosos se utilizaron: un cubo con agujeros ("Caja"); un cilindro de anillos concéntricos ("Torre") y un juguete ovoidal con tres figuras de pato ("Patos"). En el Experimento 1, se trabajó con ratas intactas que fueron expuestas a un Hole-Board modificado con detección automática de actividad motora (OVM), sin ningún objeto ($n=12$), con la "Torre" ($n=11$), con la "Caja" ($n=15$) y con los "Patos" ($n=20$). En el Experimento 2, como información preliminar para el estudio del hipocampo en la motivación exploratoria, se usaron animales implantados con cánulas de microinyección en el hipocampo ($n=20$) y se evaluó el posible cambio (efecto de la intervención quirúrgica) en la exploración inducida por el objeto novedoso. Los resultados mostraron que los animales exploraron significativamente más la "Torre" o la "Caja" que los "Patos" ($40 \pm 5,7$ s Vs $24 \pm 2,4$ s, tiempo de exploración focalizada "Torre" Vs "Patos", $p < 0,01$). La actividad horizontal y ambulatoria, estuvo significativamente disminuida en el OVM enriquecido con los objetos comparada con el mismo ambiente sin objetos ($2534,6 \pm 118,8$ cuentas/5min Vs $3974 \pm 355,6$ cuentas/5 min, $p < 0,01$; actividad horizontal, "Torre" Vs nada; 2248 ± 116 cuentas/5 min Vs 2993 ± 333 cuentas/5 min, $p < 0,01$; actividad ambulatoria, "Torre" Vs nada). La intervención quirúrgica al hipocampo no modificó la exploración focalizada de la "Torre" en el OVM con objeto. Los datos sugieren que la rata es capaz de discriminar los objetos novedosos donde ciertas formas geométricas son más incenti-vantes que otras.

103. (3245) LAS NEURONAS HISTAMINA-SENSIBLES DEL HIPOCAMPO MODULAN LA DISCRIMINACIÓN EXPLORATORIA EN AMBIENTES CONFLICTIVOS. ALVAREZ, EDGARDO O.; ALVAREZ, PABLO A.

Universidad Nacional de Cuyo UNEFCO, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

Evidencias previas de este laboratorio han mostrado que la rata posee capacidad discriminatoria para objetos novedosos en la exploración de ambientes neutros. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si en la exploración de ambientes novedosos conflictivos la capacidad discriminadora de los animales puede ser modificada por la activación hipocampal de neuronas histamina-sensibles. Se trabajó con un total de 94 ratas implantadas con cánulas de microinyección en el hipocampo ventral. En el Experimento 1, grupos de animales fueron microinyectados o con salina (n=10), 9 nmol de histamina (n=11) o 90 nmol de histamina (n=8). Todos los grupos fueron expuestos 5 min después a un laberinto en cruz-elevado asimétrico enriquecido con un objeto incentivante en el brazo "Sin Pared" (mayor temor). Además, como control absoluto se incluyó un grupo inyectado con salina en el laberinto sin el objeto (n= 11). En el Experimento 2, se incluyeron grupos tratados previamente con pirilamina (antagonista histaminérgico H1, n=12) o ranitidina (antagonista histaminérgico H2, n=11) y 5 min después con 9 nmol de histamina, además de los animales tratados con salina con o sin objeto. En el Experimento 1, los resultados mostraron una inhibición significativa de la motivación exploratoria en las ratas tratadas con histamina (2.36 ± 6.55 s Vs 13.74 ± 7.45 s; histamina 9 nmol Vs salino, $p < 0.01$). En el Experimento 2, la inhibición selectiva con histamina fue totalmente bloqueada por el tratamiento de pirilamina o ranitidina (16.55 ± 2.96 s Vs 0 ± 1.38 s; pirilamina + histamina Vs sal + histamina, $p < 0.01$). Los resultados son compatibles con la idea que las neuronas histamina-sensibles del hipocampo modulan la discriminación exploratoria de objetos novedosos en ambientes conflictivos.

104. (3327) RELACIÓN ENTRE LA UTILIZACIÓN DE DRUGAS ANTICOLINÉRGICAS Y LA RESPUESTA TERAPÉUTICA A LOS ANTIPSICÓTICOS ATÍPICOS EN LA ESQUIZOFRENIA. ZELASCHI, NORBERTO; JUANA LEONOR, RODRIGUEZ; SERGIO OMAR, PANIZZO; MARIA EUGENIA, PALACIOS VALLEJOS; LUIS MARIA, ZIEHER

Dirección Asociada de Rehabilitación, Hospital Neuropsiquiátrico "Dr. Alejandro Korn" Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Universidad de Buenos Aires (UBA)

Introducción: Con anterioridad hemos mostrado evidencia clínica de la superioridad de la clozapina (CLOZ) con respecto a la risperidona (RIS) y la olanzapina (OLAN). Aquí hipotetizamos que la mas potente actividad dopamina-bloqueante de la RIS y la OLAN, con relación a la CLOZ, prevé mayores efectos colaterales neurológicos, mayor uso de drogas anticolinérgicas (Dac) y una mas pobre respuesta terapéutica antipsicótica. Método: Se estudiaron 39 pacientes esquizofrénicos (criterio DSM-IV), hospitalizados (x edad ± 1 DS = 48 ± 8.20) y resistentes a drogas convencionales (criterio de Kane, 1988). Antipsicóticos empleados: CLOZ: n=12, dosis/d=200-400mg; RIS: n =14, dosis/d=2-6mg, OLAN: n=13, dosis/d=2-6mg). Droga anticolinérgica usada: biperideno: n=10, dosis/d=2-4 mg. El seguimiento fue de 24 meses y las evaluaciones realizadas mensualmente (escala CGI- Clinical Global Impresion-). Los pacientes fueron informados sobre la posibilidad de mejorar su calidad de vida con el tratamiento y consintieron verbalmente con el cambio; todas las drogas fueron provistas por la hospital. Resultados: En ningún paciente se asoció Dac al tratamiento con CLOZ (0:12), sí se asoció en 6 pacientes con RIS (6:14) y en 4 pacientes con OLAN (4:13); $x(2) = 6.61$, $p < 0.05$; el rango en semanas (s) en que se mantuvo la asociación RIS + Dac fue de: 8 s - 96 s ($x \pm 1$ DS = 67.20 ± 41.03 s) y para la asociación OLAN + Dac fue de: 8 s - 24 s

($x \pm 1$ DS = 14 ± 7.66 s). Ningún paciente recayó con CLOZ durante los 24 meses del seguimiento; con la RIS, 5 (35.75%) recayeron durante el primer año y 6 mas en el segundo año (tot = 78.57%); con la OLAN recayeron 10 (76.92%) durante el primer año y 1 más en el segundo año (tot = 84.61%); $x(2) = 29.17$, $p=0.000$] Conclusiones: Estos resultados sugieren que el uso de Dac se relaciona con: a) el uso de antipsicóticos atípicos con potente actividad dopamina-bloqueante con mayores efectos colaterales neurológicos; b) los efectos terapéuticos mas débiles de la RIS y la OLAN con relación a la CLOZ. Además toda aserción podría ser mas valida para el caso de la RIS debido a la particularidad de permitir un más prolongado periodo de seguimiento.

105. (3384) EVALUACION LONGITUDINAL DE LA NEUROCOGNICIÓN EN PACIENTES ESQUIZOFRÉNICOS TRATADOS CON DRUGAS ANTIPSICÓTICAS. PALACIOS VALLEJOS, MARIA EUGENIA; ZELASCHI, NORBERTO; RODRIGUEZ, JUANA; ZIEHER, LUIS MARIA

Hospital Dr. A. Korn Facultad de Cs. Médicas. U.N.L.P. Facultad de Medicina. U.B.A.

Introducción: Las drogas antipsicóticas atípicas (APA) podrían mejorar el funcionamiento neurocognitivo en pacientes esquizofrénicos. Aquí nosotros hipotetizamos que existe una mejoría particularmente en la memoria de trabajo y en la función ejecutiva que es estable en el tiempo. Hemos realizado un seguimiento, en esta ocasión comunicamos los resultados obtenidos luego de 12 meses de tratamiento. Método: Se estudiaron 30 pacientes con diagnóstico de esquizofrenia (criterio DSM-IV) tratados con dosis terapéuticas con antipsicóticos convencionales (APT)- ej: haloperidol- (n=15) y con antipsicóticos atípicos (APA) -ej: clozapina y olanzapina_ (n=15); además se incluyeron dos grupos de control: pacientes no psicóticos bajo tratamiento psiquiátrico (GC) (n=15) y sujetos normales (GN) (n=25). Se utilizó una batería neuropsicológica compuesta por la Escala de Inteligencia de Wechsler (WAIS III) y el Wisconsin Card Sorting Test (WCST). Se usó un test de Anova no paramétrico (Kruskall-Wallis), todos los valores se expresan en promedio ± 1 DS. Resultados: Los grupos estudiados no se diferenciaron respecto de la edad. Se observó un mejor desempeño en el grupo tratado con APA con relación al grupo con APT en las dos funciones neurocognitivas estudiadas.

	APT n=15	APA n=15	GC n=15	GN n=25	H	p
Edad	50.2 \pm 9.7	45.3 \pm 10.7	41.4 \pm 14.4	42.1 \pm 12.6	4.4077	0.2207
Promedio WAIS III						
Memoria de Trabajo	71.8 \pm 9.4	89.8 \pm 11.4	107.5 \pm 13.7	96.4 \pm 11	37.48	0.0000
WCST	4.26 \pm 3.47	11.8 \pm 4.2	10.8 \pm 6.08	13.8 \pm 4.35	21.38	0.0001

La mejoría observada en el grupo con APA luego del seguimiento prospectivo de 12 meses constituye un factor clave en el tratamiento de la esquizofrenia; la memoria de trabajo y la función ejecutiva constituyen predictores de la capacidad del sujeto para aprender habilidades y para obtener mayor competencia social.

106. (3415) CUERPO CALLOSO Y EDAD: VARIACIONES DE SUPERFICIE DE ZONAS QUE INTEGRAN SU IMAGEN EN EL PLANO SAGITAL MEDIO DE RESONANCIA MAGNETICA. ALBANESE, EDUARDO; GÓMEZ, ELENA; MERLO, ALICIA; INGRATTA, ADRIANA; MIÑO, JORGE; GRANA, DANIEL; MASCITTI, TOMÁS; CANCELTA, MARCIAL; ALBANESE, ALFONSO

Fac. Medicina. Univ. del Salvador, Fac. Medicina y Fac. Farmacia y Bioq. - UBA, Hospital Francés

En un trabajo previo (Rev Chil Anat 20:131-8, 2002) observamos en ambos sexos que la superficie total del cuerpo calloso en la imagen de resonancia magnética del plano sagital medio (IRM-PSM) disminuye después de los 60 años. Estos resultados

se suman a la abundante y controvertida bibliografía sobre aspectos morfológicos del cuerpo calloso y de sus partes, genu (G), cuerpo (C) y splenium (S) que evidencian el interés por el tema. El objetivo fue determinar en sujetos femeninos diestros, en función de la edad, variaciones de superficie de seis áreas en que dividimos a la iRM-PSM del cuerpo calloso. En iRM-PSM digitalizadas de 64 sujetos femeninos se midieron mediante el programa Scion Image las superficies correspondientes al G, C (dividido en 4) y S y se calculó el aporte porcentual de cada zona a la superficie del cuerpo calloso. Para cada rango de edades (17-40 con 26 casos, 41-60 con 17 casos y 61-84 años con 21 casos) se calcularon los valores medios \pm ES y los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los valores obtenidos y la edad. Sólo para el rango de edad de 61-84 años, hallamos r estadísticamente significativos. En dicho rango, el r entre edad y superficie fue -0.85 para el G ($p < 0.01$); -0.56 para el C-parte1 ($p < 0.01$); -0.58 para el C-parte2 ($p < 0.01$); -0.72 para el C-parte3 ($p < 0.01$); -0.78 para el C-parte4 ($p < 0.01$) y -0.29 para el S (no significativo). El r entre el porcentaje de superficie del S y la edad después de 60 años fue de 0.66 ($p < 0.01$). Después de los 60 años la superficie de 5 sobre 6 de las zonas en que se dividió al cuerpo calloso (el genu y las 4 partes del cuerpo) disminuyen significativamente con el avance de la edad mientras que la superficie del splenium no se modifica significativamente. Consecuentemente su aporte porcentual a la superficie del cuerpo calloso aumenta.

- 107. (3417) CEREBELO Y EDAD: VARIACIONES DEL PERÍMETRO Y SU RELACION CON LA SUPERFICIE EN LA IMAGEN DEL PLANO SAGITAL MEDIO DE RESONANCIA MAGNETICA.** MERLO, ALICIA; ALBANESE, EDUARDO; GÓMEZ, ELENA; INGRATTA, ADRIANA; MIÑO, JORGE; GRANA, DANIEL; MASCITTI, TOMÁS; CANCELA, MARCIAL; ALBANESE, ALFONSO

Fac. Medicina - Univ. del Salvador, Fac. Medicina y Fac. Farmacia y Bioq. UBA, Hospital Francés

Este trabajo integra una línea de investigación sobre modificaciones morfológicas de estructuras encefálicas con la edad. En una comunicación previa (SAIC 2002) mostramos que en el plano sagital medio (PSM) la superficie del cerebelo (CER) entre los 17 y 84 años disminuye en ambos sexos. El objetivo del presente estudio es determinar el perímetro del CER y su relación con la superficie en imágenes digitalizadas de resonancia magnética del PSM en función de la edad. Se estudiaron 98 sujetos normales diestros de ambos sexos (64 femeninos y 34 masculinos) de 17 a 84 años en los que mediante el programa Scion Image for Windows se midieron la superficie y el perímetro del CER. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (r) y su significación estadística entre edad y superficie, edad y perímetro y edad y diferencia porcentual (DIF%) entre el perímetro hallado y el perímetro mínimo que correspondería a cada superficie, o sea la longitud de la circunferencia de un círculo de las dimensiones de la superficie medida. Mientras que la superficie disminuye, el perímetro y la DIF% incrementan al avanzar la edad. Los r entre edad y superficie, perímetro y DIF% son en el sexo masculino -0.47 ($p < 0.01$); 0.40 ($p < 0.05$) y 0.48 ($p < 0.01$) y en el femenino -0.33 ($p < 0.01$); 0.30 ($p < 0.02$) y 0.50 ($p < 0.01$). En el corte del PSM el perímetro del CER en ambos sexos aumenta con el avance de la edad. Debido a una disminución simultánea de la superficie, desde los 17 a los 84 años se produce el incremento de la a DIF% indicando modificaciones en la forma del CER. Este tipo de variaciones no es exclusivo del CER ya que, con el avance de la edad, hallamos cambios de forma en la imagen del cuerpo calloso en el PSM (Rev Chil Anat 20: 131-138, 2002).

- 108. (3460) HIPERRESPUESTA DE PARÁMETROS NEUROQUÍMICOS HIPOTALÁMICOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR) TRATADAS CON DOCA.** PIETRANERA, LUCIANA; SARAVIA, FLAVIA; LIMA, ANALÍA; ROIG, PAULINA; DE NICOLA, ALEJANDRO F.

Instituto de Biología y Medicina Experimental y Dep. de Bioquímica Humana, Fac. de Medicina, UBA

En la rata SHR, y en otros modelos de hipertensión y pre-hipertensión, demostramos cambios en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, tales como aumento en el ARNm de AVP y de la proteína c-Fos. En los animales SHR se ha sugerido la participación de los mineralocorticoides y su receptor en la génesis de la hipertensión arterial. Nuestro objetivo fue investigar la respuesta a un estímulo agudo con el mineralocorticoide desoxicorticosterona (DOCA) en animales SHR y sus controles WKY. Los animales fueron tratados con 10 mg de DOCA y sacrificados a las 2 hs. (SRH DOCA y WKY DOCA). Los grupos controles fueron inyectados con vehículo (SHR CTL y WKY CTL). Se cuantificaron por inmunohistoquímica el receptor de AVP V1a (V1aR) y c-Fos y por hibridización in situ el ARNm de AVP. Los animales SHR mostraron una respuesta aumentada del V1aR en el PVN comparado con WKY y una hiperrespuesta al estímulo con DOCA (WKY CTL: 31.52 ± 6.38 ; WKY DOCA: 54.26 ± 7.02 ; SHR CTL: 80.99 ± 4.61 ; SHR DOCA: 122.6 ± 10.48 cels+/hemiPVN; WKY CTL vs. SHR CTL: $p < 0.001$; SHR DOCA vs. SHR CTL: $p < 0.01$). El mismo efecto se observó para el ARNm de AVP (WKY CTL: 31.71 ± 7.31 ; WKY DOCA: 35.32 ± 2.52 ; SHR CTL: 64.32 ± 3.62 ; SHR DOCA: 84.79 ± 1.64 cels+ / hemiPVN; WKY CTL vs. SHR CTL: $p < 0.001$; SHR DOCA vs. SHR CTL: $p < 0.05$). La expresión de c-Fos no fue modificada por DOCA en el PVN de ratas SHR pero sí en el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVL, $p < 0.001$). Estos resultados sugieren la hipersensibilidad a los mineralocorticoides de las regiones hipotalámicas y pre-hipotalámicas íntimamente ligadas al control cardiovascular en ratas SHR.

- 109. (3467) APOPTOSIS Y MAPK EN UN MODELO DE HIPOXIA AGUDA PRE-NATAL.** VACOTTO, MARINA; POZO DEVOTO, VICTORIO; COSO, OMAR; FISZER DE PLAZAS, SARA

Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Prof. E. De Robertis LF y BM, Facultad de Ciencias Exatas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

La exposición del SNC a condiciones hipóxicas produce desórdenes funcionales en la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria, asociados con la activación de diferentes vías de señalización y muerte celular. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar en el día embrionario (DE) 12 las alteraciones moleculares producidas por una hipoxia hipóxica aguda normobárica, evaluadas a diferentes tiempos post-injuria. A tal fin, se aplicaron dos metodologías: 1) detección de fragmentación del ADN sobre cortes de lóbulo óptico (LO), mediante TUNEL de fluorescencia; y 2) expresión de los niveles de proteína quinasas JNK y P-JNK en fracciones citosólicas de LO, mediante Western Blot. En el DE12, resultados previos sobre la unión de $[^3H]$ MK-801 al receptor NMDA, demostraron que la hipoxia produce una reducción del 50% en el número máximo de sitios de unión (Bmax) de baja afinidad, la cual se mantuvo irreversible en los embriones retornados durante una semana a una atmósfera normóxica. Los ensayos de TUNEL revelan un aumento significativo en el número de células picnóticas en los embriones hipóxicos vs controles, luego de 1 y 6 hs. post-injuria (50 y 200%, respectivamente). Las determinaciones por Western Blot muestran que el tratamiento produce un aumento de los niveles de JNK y P-JNK respecto del control. El análisis post-hipoxia de la expresión de estas quinasas muestra una disminución de la forma inactiva entre los 10 min. y las 2 hs., mientras que los niveles máximos de la forma activa se alcanzan a los 10 min. (relación P-JNK / JNK = $6,746 \pm 1.060$, $n = 5$, $P < 0.01$). En conclusión, los resultados a nivel molecular sugieren que uno de los posibles mecanismos desencadenados por la hipoxia sería un proceso de muerte celular programada, que correlaciona con una previa activación de JNK.

- 110. (3545) EVOLUCIÓN A LARGO PLAZO HACIA SUBPOBLACIONES NEURONALES EN CULTIVOS DE HIPOCAMPO DE RATAS ADULTAS.**

IELPI, MARCELO; CRISTIANO, AGUSTÍN; HIDALGO, ALEJANDRA; ARGIBAY, PABLO

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires.

El hipocampo exhibe una remarcable capacidad plástica y ha sido asociado a procesos como el aprendizaje y la memoria. Si bien los estudios in vivo en animales y sobre cortes de cerebro han arrojado luz sobre el sustrato histológico de sus funciones, poco es lo que se ha elucidado en cultivos de células provenientes de cerebros adultos, limitándose en general dichos estudios a células provenientes del hipocampo de fetos o neonatos debido a la gran dificultad que representa el cultivo a partir de tejido adulto. Es el objetivo del presente trabajo presentar nuestra experiencia con cultivos de explantos obtenidos a partir de hipocampos de animales adultos y mantenidos a largo plazo en condiciones variables de cultivo. Los animales utilizados fueron machos adultos de 60 a 75 días de edad, a los cuales se les extrajeron quirúrgicamente los hipocampos. Estos fueron cortados en fragmentos de aproximadamente 1 mm³, adheridos a la placa mediante la utilización de SFB y cultivados utilizando D-MEM/F12 (1:1) suplementado. El tiempo de incubación fue de 75 días. El patrón regular observado consistió en un crecimiento en 4 etapas: 1. Hasta el día 30: monocapa de aspecto fibroblastoide, 2. Entre 30 y 45 días: diferenciación en células de aspecto neuronal. 3. A partir de los 60 días: proliferación de esta capa "neurona símil" y retracción de la monocapa fibroblastoide. 4. Predominio neuronal con establecimiento de conexiones. La principal variable reguladora de esta diferenciación fue el agregado de concentraciones variables de SFB y de factores que favorecen la proliferación y diferenciación neuronal. Estos resultados, si bien preliminares abren una posibilidad interesante de estudio de las subpoblaciones celulares hipocámpales in vitro bajo diferentes condiciones fisiológicas.

111. (3549) CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE AZÚCARES DE SUPERFICIE EN CULTIVOS DE HIPOCAMPO DE RATA ADULTA. BURGOS, VALERIA; CRISTIANO, AGUSTÍN; HIDALGO, ALEJANDRA; IELPI, MARCELO; ARGIBAY, PABLO

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental Hospital Italiano de Buenos Aires

Estudios neuroglicobiológicos destacan la importancia de los oligosacáridos expresados por las glicoproteínas de superficie celular y matriz extracelular en diferentes interacciones. Los trabajos que estudian la expresión de azúcares en células de cerebro reportados hasta el momento se realizaron en cortes histológicos, quizás por las dificultades del cultivo de neuronas adultas. Sin embargo la fácil manipulación de las células en cultivo haría deseable este tipo de estudios. El objetivo del presente trabajo es estudiar la expresión terminal de oligosacáridos en cultivos de células provenientes de hipocampos adultos a través de técnicas de marcación con lectinas específicas. Se cultivaron explantos de hipocampo de ratas Wistar adultas (P75), que fueron cultivados en su fase inicial con D-MEM y 10% SFB y posteriormente con D-MEM con factores de proliferación. Una vez fijados, los cultivos fueron incubados con un panel de lectinas fluorescentes específicas para todos los azúcares. En el análisis con microscopio de fluorescencia se observó que el epítipo Man alfa-1,3 terminal marcó claramente en todo el soma y prolongaciones de dos tipos celulares cuya morfología es neurona símil y astrocitos. La expresión del epítipo alfa/beta-NACGal terminal se detectó solamente en el soma de un tipo celular con morfología atípica poligonal aparentemente de estirpe neuronal. Las células fibroblastoides dieron una marca leve para manosas terminales y ausencia de marca para otros azúcares. Dada la importancia que los glicoconjugados de superficie tienen en los procesos de señalización, la caracterización de estos en subpoblaciones celulares provenientes de hipocampos adultos abre una vía de estudio in vitro de los procesos funcionales asociados con la expresión de dichas moléculas.

112. (3552) LA ACTIVACIÓN DEL GLOBO PÁLIDO VENTRAL MODIFICA LA ACTIVIDAD NEURONAL EN EL NÚCLEO RETICULAR DEL TÁLAMO Y EN EL EEG. BERNADETTE

ABADÍA, M; RUIZ, M GUILLERMINA; BELFORTE, JUAN E; PAZO, JORGE H

Laboratorio de Neurofisiología, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, UBA.

El núcleo reticular del tálamo (NRT) tiene un papel fundamental en la actividad talámica, debido a su acción inhibitoria y sus conexiones con los otros núcleos del tálamo. Esto le permite modular las aferencias tálamo-corticales y cortico-talámicas. El globo pálido ventral (GPv) desempeñaría un rol importante en la regulación de la actividad neuronal del NRT, ya que estudios neuroanatómicos demostraron la existencia de una proyección hacia este. Con el objetivo de estudiar la relación funcional del GPv con el NRT se realizaron registros extracelulares de la actividad unitaria en el NRT, en ratas anestesiadas con uretano (1,2 g/kg) y fijadas a un marco estereotáxico. El GPv fue estimulado eléctrica y químicamente. Esta última consistió en la microinyección de bicuculina (antagonista GABA-A 25ng/0,3ul). Simultáneamente se registró la actividad electroencefalográfica (EEG) de la corteza frontal. Se registraron en total 23 neuronas del NRT con una actividad espontánea promedio de $15,2 \pm 2,5$ Hz. La estimulación eléctrica del GPv, mediante un electrodo bipolar, inhibió la actividad espontánea de 8 de 15 neuronas del NRT ($63,4 \pm 9\%$ Student test pareado $t_8 = 4,5$; $p < 0,01$). La microinyección de bicuculina en el GPv tuvo un efecto inhibitorio significativo en 6 de 8 neuronas analizadas ($59,5 \pm 6,9\%$ Student test pareado $t_6 = 5,7$; $p < 0,005$). Dicha inhibición se vio acompañada por una intensificación de la descarga en salvas y aumento de la actividad de ondas lentas del EEG. De lo anterior concluimos que el GPv regula el patrón y la frecuencia de descarga de las neuronas del NRT. Lo que se refleja en modificaciones del EEG.

PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR I

113. (3293) RESPUESTA IN VITRO DE LINFOCITOS PERIFÉRICOS PORCINOS A LA PROGESTERONA. CUELLO, MARÍA FERNANDA; VIVAS, ADRIANA; GRECO, CELILIA

Universidad Nacional de Río Cuarto Dpto Microbiología e Inmunología, Fac.Cs Exactas,Fco-Qcas y Naturales y Dpto Anatomía Anim. UNRC

La inmunomodulación por progesterona (P4) en la preñez ha recibido mucha atención en los últimos años ya que esta hormona es esencial en el mantenimiento de la misma. Se ha demostrado, en humanos y murinos, la existencia de receptores para (P4) sobre los linfocitos T (LT) cuya expresión está aumentada durante la preñez, no así en la especie porcina. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta in vitro de linfocitos periféricos porcinos a la P4. Se separaron los linfocitos periféricos de 21 cerdas vacías Landrace x Yorkshire con Histopaque ($d=1077$ g/ml), se cultivaron en placas de 96 pocillos sin y con P4 y controles positivos de estimulación (PHA-M y Con-A) durante 72 horas a 37°C con 5% de CO₂. A las 48 horas se agregó 1 μ Ci de [3H]-TdR en cada pocillo. Las células se recogieron a las 72 horas utilizando un cosechador de células y se midió la radiactividad incorporada. Se confeccionó la curva dosis-respuesta para cada sustancia con: 0,05; 0,08; 0,1; 0,2; 0,4 y 0,8 μ g/ml para P4, 10 y 25 μ g/ml para PHA-M y 5 y 10 μ g/ml para Con-A. Se calculó el Índice de Estimulación Linfocitaria (IEL) considerándose valores = 0,5 indicativos de estimulación. La mejor respuesta de los LT porcinos se obtuvo con 25 μ g/ml de PHA-M y 5 μ g/ml de Con-A, mientras que con P4 comenzaron a responder efectivamente desde 0,08 μ g/ml (IEL=0,75) hasta los 0,4 μ g/ml (IEL=0,72), a partir de esta concentración la respuesta disminuyó. Podemos concluir que los linfocitos T porcinos responden a la PHA-M en concentraciones mayores que los murinos y humanos y que la respuesta a P4 es uniforme en un rango de 0,08 a 0,4 μ g/ml. Demostrar la respuesta de los linfocitos porcinos a la P4 permitirá el estudio del papel inmunomodulador de esta hormona en la preñez.

114. (3482) LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO PROVENIENTES DE PORTADORES DE TUMOR ES MODULADA POR EL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO PARASIMPÁTICO. DE LA TORRE, EULALIA; GENARO, ANA M.; DAVEL, LILIA; RIBEIRO, MARIA L; REARTE, BARBARA; SACERDOTE DE LUSTIG, EUGENIA; SALES, MARIA ELENA

Instituto de Oncología Angel H. Roffo CEFYBO-CONICET

Hemos demostrado que macrófagos de animales portadores de la línea tumoral LMM3 (MfsT) inducen respuesta angiogénica positiva que se incrementa por activación de receptores muscarínicos (M). Investigamos la participación de M en la proliferación, medida in vitro por incorporación de timidina tritiada, en MfsT (de 7 y 14 días de portación del tumor) y en MfsN (provenientes de animales normales). Demostramos que el agonista muscarínico carbacol (CARB) (0,1 μ M) estimula la proliferación de MfsT7 (58%), MfsT14 (74%) y MfsN (81%) con respecto al basal ($p < 0,002$), efecto que fue bloqueado por el agregado de atropina (1 μ M) en todas las poblaciones estudiadas. La estimulación ejercida por CARB se revirtió por 4-DAMP, antagonista M[3], en MfsT7 y T14 y por metocramina (MET), antagonista M[2] en MfsN. Por Western Blot (Wb) confirmamos la expresión de los receptores M[3] y M[2] en las poblaciones mencionadas. Además, la estimulación de la proliferación se inhibió por pretratamiento de todas las poblaciones de Mfs con indometacina, inhibidor no selectivo de ciclooxigenasas (COX) y por NS-398, inhibidor de COX-2. Comprobamos un aumento de la expresión de COX-1 y -2 en ambas poblaciones de Mfs por Wb. El agregado de N(w)-L-hidroxiarginina, inhibidor de arginasas, revirtió el estímulo de la proliferación ejercido por CARB en MfsT. Por otra parte, la preincubación de MfsN con H-7, inhibidor de proteína quinasa C (PKC), bloqueó el efecto de CARB. Confirmamos que el agonista activa dicha enzima, por traslocación de la misma a la fracción de membrana (100%), que se revierte por preincubación con MET. Concluimos que la estimulación muscarínica incrementa la proliferación de MfsT con participación de COX y arginasas, mientras que en MfsN, además de las COX participa también la PKC.

115. (3799) LOS INHIBIDORES DE TRIPSINA DE LA SOJA (SBTI) Y DE PELTOPHORUM DUBIUM (PDTI) CAUSAN APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS JURKAT DE LEUCEMIA HUMANA. TRONCOSO, MARÍA FERNANDA; LONGHI, SILVIA A.; RETEGUI, LILIA A.; WOLFENSTEIN-TODEL, CARLOTA

IQUIFIB Fac de Farmacia y Bioqca UBA

Los inhibidores de serina-proteinasas poseen efectos anti-inflamatorios, sobre la coagulación y la fibrinólisis, y algunos previenen o suprimen la transformación inducida por carcinógenos in vitro e in vivo. En nuestro laboratorio se describió que los inhibidores de tripsina de la soja y de las semillas de la leguminosa, Peltophorum dubium, inducen apoptosis de las células Nb2 de linfoma de rata. El objetivo actual fue evaluar el efecto de dichas proteínas sobre células Jurkat de leucemia humana. La viabilidad celular, determinada utilizando un "kit" comercial de proliferación celular indicó que al tratar las células con SBTI y PDTI 25 μ M la viabilidad disminuyó un 40 \pm 18% ($p < 0,01$) y 25 \pm 13% ($p < 0,05$), respectivamente, con respecto a las células sin tratar. La hipodiploidía del ADN se analizó por tinción con iodo de propidio y citometría de flujo, y se determinó que SBTI y PDTI 25 μ M provocaron un aumento de 2 y 3 veces, respectivamente, en el porcentaje de núcleos hipodiploides. Por medio de tinción con Anexina V-FITC en combinación con iodo de propidio, se observó que SBTI 25 μ M aumentó al doble y al triple el porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía, respectivamente, con respecto al control. En cambio, PDTI 25 μ M sólo incrementó la apoptosis tardía al doble. La presencia de células necróticas se descartó por tinción diferencial con bromuro de etidio y naranja de acridina. La actividad de la caspasa-3, determinada fluorimétricamente, aumentó de 19,4 \pm 0,2 unidades de

fluorescencia relativa para el control, a 31,9 \pm 4,3 ($p < 0,05$) unidades en presencia de SBTI 25 μ M, mientras que PDTI no causó diferencia significativa ($p > 0,05$). Los resultados obtenidos sugieren que tanto SBTI como PDTI causan apoptosis de las células Jurkat, siendo SBTI el más potente.

116. (3805) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVIDAD PROTECTORA DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE EL EFECTO CITOTÓXICO DEL CADMIO EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS. POLIANDRI, ARIEL; MACHIAVELLI, LETICIA; CABILLA, JIMENA; QUINTEROS, FERNANDA; DUVILANSKI, BEATRIZ

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Previamente demostramos que el óxido nítrico (NO), tanto endógeno como exógeno, protege a las células adenohipofisarias en cultivo del efecto citotóxico del cadmio (Cd). Nuestro objetivo fue examinar si el Cd estimula la síntesis de NO y los posibles mecanismos por los cuales el NO ejerce el efecto protector. El Cd 25 microM aumentó la producción de NO, método de Griess-reductasa, micromol nitritos/(L x mg proteínas), Control: 5.55 \pm 0.48; Cd, 24 h: 19.71 \pm 1.53 ***; Cd, 48 h: 24.23 \pm 1.70 ***; n=6, *** $p < 0.001$ vs control. El DETA/NO 0.1 mM, dador de NO, redujo el número de células con morfología nuclear apoptótica inducida por Cd 25 microM, de células (tinción nuclear con DAPI) con morfología nuclear apoptótica: Control 1.9 \pm 0.5; DETA/NO 5.6 \pm 1.8; Cd 18.5 \pm 2.7 ***; Cd DETA/NO 12.2 \pm 2.5 **^; n =3, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control; ^ $p < 0.05$ vs Cd). El DETA/NO 0.1 mM revirtió marcadamente la activación de caspasa 3 inducida por Cd 25 microM, método enzimático, Abs x 100/(Abs control x mg de proteínas), DETA/NO: 82 \pm 5; Cd: 235 \pm 30 ***; Cd DETA/NO: 111 \pm 1.2^^; n=4, *** $p < 0.001$ vs control, ^^ $p < 0.001$ vs Cd. El 8-Br-cGMP, un análogo no hidrolizable del cGMP, no reprodujo el efecto del NO y el LY85583, un inhibidor de la guanilato ciclasa, no potenció el efecto citotóxico del Cd. Estos resultados sugieren que las células adenohipofisarias reaccionan ante el efecto citotóxico del Cd con un aumento en la síntesis de NO el cual reduce marcadamente la activación de caspasa 3 inducida por el metal. El cGMP no estaría involucrado en el efecto protector del NO. Dado que los antioxidantes protegen del efecto citotóxico del Cd podríamos postular que el NO ejerce su efecto actuando como un antioxidante o potenciando las defensas antioxidantes celulares.

117. (3807) EFECTO DE LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS CROMO VI Y NIQUEL II SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR ADENOHIPOFISARIA. QUINTEROS, FERNANDA; POLIANDRI, ARIEL; MACHIAVELLI, LETICIA; DÍAZ, MARÍA DEL CARMEN; DUVILANSKI, BEATRIZ

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

El cromo VI (Cr) y el níquel II (Ni) se encuentran en concentraciones altas en zonas urbanas e industriales. Estos metales afectan al sistema endocrino. Poco se conoce sobre su mecanismo de acción a nivel hipofisario. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de ambos metales sobre la viabilidad celular en cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas machos. Como índice de viabilidad se midió la actividad deshidrogenasa mitocondrial (AC, método de MTT). Las células fueron incubadas por 48 h con concentraciones crecientes de Cr o Ni. El Cr disminuyó la AC (Abs a 600nm) a concentraciones iguales o superiores a 1 microM mientras que el Ni lo hizo a concentraciones superiores a 100 microM (AC, del control), Cr 1 microM: 82.1 \pm 3.3 ***; Cr 10 microM: 33.5 \pm 1.3 ***; Cr 50 microM: 5.2 \pm 0.5 ***; Ni 200 microM: 78.8 \pm 2.7 ***; n=8; *** $P < 0.001$ vs control. El

efecto del Cr se volvió irreversible a partir de las 3 h (AC determinada a las 48 h, del control), Cr, 3 h: $92.3 \pm 2.6^*$; Cr, 6 h: $80.6 \pm 3.7^*$; $n=8$; $p<0.05$ vs control. El Cr 10 microM aumentó el número de células con morfología nuclear apoptótica (de células con núcleos condensados y fragmentados (tinción con DAPI): Control, 12 h: 3.2 ± 1.5 ; Cr, 12 h: $10.2 \pm 0.5^{**}$; Control, 24 h: 3 ± 1.4 ; Cr, 24h: $17.7 \pm 1.8^{***}$; $**p<0.01$, $***p<0.001$ vs respectivo control). El Cr 10 microM incrementó la actividad de caspasa 3, método enzimático, Abs x 100/(Abs control x mg de proteína): Cr, 12 h: 404.8 ± 35 ; Cr, 24 h: 631.87 ± 23 . Ambos metales afectaron la liberación de prolactina. Estos resultados sugieren que tanto el Cr como el Ni podrían afectar en forma directa a la adenohipófisis. El Cr ejercería su efecto deletéreo por un mecanismo del tipo apoptótico.

118. (3813) PAPEL DEL SISTEMA FAS/FASL EN LA ADENOHIPÓFISIS. JAITA, GABRIELA ALEJANDRA; CANDOLFI, MARIANELA; ZALDIVAR, VERONICA; FERRARI, LUCIANA; PISERA, DANIEL; SEILICOVICH, ADRIANA

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina, UBA

El FasL es el único ligando fisiológico conocido del receptor Fas. La activación de Fas inicia señales intracelulares que resultan en la muerte por apoptosis. Este receptor está ampliamente distribuido en tejidos normales. FasL ha sido observado en diversos tejidos tales como tiroides, adenohipófisis y útero. En este trabajo, hemos investigado la presencia del sistema Fas/FasL en células adenohipofisarias por inmunocitoquímica. También evaluamos el efecto de la activación de Fas (con un anticuerpo monoclonal anti-Fas, Mab-Fas, 1ug/ml) sobre la actividad metabólica (por MTT) y la inducción de apoptosis (por TUNEL) en cultivos de células adenohipofisarias de ratas ciclanes y ovariectomizadas (OVX). El Fas está expresado aproximadamente en un 25% y el FasL en un 35% de las células adenohipofisarias. La presencia de Fas y FasL fue localizada en lactotropos, somatotropos y otros tipos celulares aún no identificados. La incubación con Mab-Fas redujo la actividad metabólica de células adenohipofisarias provenientes de ratas en proestro (C: 0.159 ± 0.003 ; Mab-Fas: 0.140 ± 0.004 ; $p<0.01$) pero no en diestro (C: 0.115 ± 0.003 ; Mab-Fas: 0.112 ± 0.002). La activación de Fas también disminuyó la actividad metabólica de células adenohipofisarias de ratas OVX incubadas con 17β estradiol (C: 0.215 ± 0.004 ; Mab-Fas: 0.190 ± 0.005 ; $p<0.001$). Además, Mab-Fas aumentó el porcentaje de células TUNEL positivas en cultivos de células adenohipofisarias de ratas OVX incubadas tanto en presencia como en ausencia de estradiol ($p<0.05$; χ^2). Nuestros resultados indican que el sistema Fas/FasL está presente en la adenohipófisis y que la activación del receptor Fas induce apoptosis de células adenohipofisarias.

119. (3815) COACTIVADORES DE LA FAMILIA P160 PROTEGEN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR VIA MITOCONDRIAL Y DE MEMBRANA. COLO, GEORGINA PAMELA; NOJEK, IGNACIO M; RUBIO, MA FERNANDA; COSTAS, MONICA A

Instituto de Inv. Medicas A. Lanari Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari UBA-CONICET

Los coactivadores de receptores nucleares se encuentran sobreexpresados en ciertos tumores, aumentando su proliferación y disminuyendo su sensibilidad a apoptosis. Hemos demostrado que los coactivadores de la familia p160, aumentan la actividad del factor anti-apoptótico NF-kB. Los coactivadores RAC3, SRC-1 y CBP/p300 presentan actividad acetil transferasa, esto podría contribuir a un aumento de la actividad de NF-kB y otros factores, y una disminución en la sensibilidad a apoptosis. De acuerdo con estas evidencias se estudio el efecto de la sobreexpresión de estos coactivadores sobre la viabilidad de células HEK293 y L-929, en respuesta a distintos estímulos (vía receptores de mem-

brana y vía mitocondrial). Estudiamos los niveles de expresión de genes pro-apoptóticos y activación de caspasas. Se observó: Disminución de la sensibilidad a apoptosis por peróxido de hidrógeno en células HEK293 y por TNF- α en células L-929, que sobreexpresan RAC3, SRC-1 y CBP (cristal violeta y apoptosis assay). Aumento en un 82% de la actividad transcripcional NF-kB en células que sobre expresan RAC3 respecto a las transfectadas con vector vacío (ensayo de genes reporteros kB luc). Disminución de la traslocación de AIF al núcleo (inmuno-fluorescencia) en células HEK 293 que sobreexpresan RAC3, en presencia de 1.6uM de peróxido de hidrógeno. Disminución de la activación de caspasa-9, traslocación de p53y AIF al núcleo por western. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de coactivadores mediante su actividad acetilasa tiene un rol protector frente a estímulos que inducen muerte celular y podría ser uno de los mecanismos de escape a la apoptosis de células tumorales.

120. (3896) REPARACIÓN DE DEFECTOS CONDRALES DE RODILLA MEDIANTE EL IMPLANTE DE CONDROCITOS AUTÓLOGOS. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN UN MODELO PORCINO. ROLDAN, FERNANDO; PUIGDEVALL, MIGUEL; MUDROVICI, DANIEL; DALLAGLIO, JUAN; SCIPIONI, HUGO; GENOVESE, JORGE

Laboratorio Craveri S.A.I.C.

La ingeniería de tejidos ha cobrado relevancia en la reparación de lesiones condrales, basadas en el uso de condrocitos autólogos expandidos in vitro e implantados en el defecto articular. Evaluamos en un modelo porcino: la reparación de defectos condrales con implantes de condrocitos autólogos; las características macro y microscópicas del tejido de reparación, y la calidad en función del tiempo desde su implante. Además, estandarizando el cultivo, evaluamos la posibilidad de adaptar las condiciones de mantenimiento y traslado de las muestras de cartilago a restricciones logísticas de nuestra región, manteniéndolas a temperatura ambiente en medio durante diferentes tiempos antes de iniciar el cultivo. También los condrocitos se cultivaron en una matriz 3D para evaluar su rediferenciación. Cada animal recibió dos cirugías, primero se tomó una muestra de cartilago para ser cultivada. En la segunda cirugía, se creó un defecto condral, que fue tratado con un implante de condrocitos autólogos colocado debajo de un parche de periostio. Se estudió el tejido de reparación a distintos tiempos hasta 6 meses de realizado el implante. Las biopsias mostraron la reparación de los defectos con la formación de un tejido de características macro y microscópicas similares a las del cartilago hialino articular ($p<0,05$). La reparación fue mayor cuanto más tiempo transcurrió. La metracromacia de la matriz 3D fue positiva. Por otro lado se observó que existe una ventana de tiempo prolongada en que las muestras se pueden conservar sin refrigerar manteniéndose viables, permitiendo así su masiva aplicación teniendo en cuenta las dificultades de comunicación entre los centros de tratamiento y el de producción celular. Concluimos que el implante de condrocitos autólogos es una opción terapéutica válida para el tratamiento de lesiones del cartilago articular.

121. (3944) EFECTO DUAL DE LA ADENOSINA Y DEL ANÁLOGO 2-CLORODEOXIADENOSINA EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE UN LINFOMA T MURINO. DUFFY, TOMAS; BARREIRO ARCOS, MARÍA LAURA; CREMASCHI, GRACIELA; GIORDANO, MIRTA; GORELIK, GABRIELA

CEFYBO-CONICET IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

La adenosina (ADO) es una importante molécula inmunoreguladora capaz de regular el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular. El propósito de este trabajo fue estudiar los efectos de la ADO y del análogo sintético (desarrollado para el tratamiento de malignidades hematológicas), la 2-clorodeoxia-denosina (2CdA), sobre la actividad proliferativa del

linfoma T murino BW5147 (BW). Para ello se determinó la proliferación celular, por incorporación de [3H]-timidina, en cultivos celulares incubados en presencia de concentraciones crecientes de ambos nucleósidos. ADO y 2CdA ejercieron un efecto dual sobre la proliferación de BW. A tiempos cortos (24 hs) incrementaron de manera dosis dependiente la proliferación, observándose un mayor efecto con ADO (% de estimulación (%E): ADO: 335±29%, 2CdA: 175±8%, 10 mM ambas, p<0.001). A tiempos más largos (72 hs), dosis bajas de ADO produjeron efectos inhibitorios (%E ADO, 0.1 mM: -51±5%, n=5), y disminuyeron los efectos proliferativos de dosis mayores. Sin embargo la 2CdA indujo inhibición a todas sus concentraciones (%E 2CdA, 10 mM: -38±3%, n=4). Los efectos inhibitorios fueron acompañados por la presencia de células con morfología nuclear apoptótica observado por tinción con Hoechst. Los efectos estimulantes de ambos nucleósidos fueron inhibidos por el bloqueante de receptores A1, DPCPX, pero no de A2, DMPX. Ambos nucleósidos aumentaron la actividad de óxido nítrico sintasa, medida por formación de [14C]-citrulina a partir de [14C]-arginina (%E respecto del basal, ADO: 57±4%, 2CdA: 63±5%, p<0.05). Concluimos que la ADO y su análogo pueden modular el balance entre crecimiento y muerte celular. Estos datos son importantes para la propuesta terapéutica de la ADO y sus análogos como coadyuvantes en el tratamiento de leucemias.

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ORAL

ONCOLOGIA II

- 122. (3682) REGULACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTITUMORAL CONCOMITANTE (CAR) POR EL BALANCE DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y ANTIANGIOGÉNICOS.** SCHAROVSKY, O. GRACIELA; ²BINDA, M. MERCEDES; ¹ROZADOS, VIVIANA R.; ³BAHGAT, SUNITA; ³CHER, MICHAEL L.; ^{2,3}BONFIL, R. DANIEL

¹Inst. Genética Exp., Fac. de Cs. Médicas, UNR, Rosario
²FUNDIC, CEFYBO, Buenos Aires, Argentina; ³WSU School of Med and Karmanos Cancer Inst, Detroit, MI, USA

El fenómeno por el cual huéspedes portadores de tumores primarios pueden inhibir el crecimiento de implantes 2arios o metástasis, conocido como CAR, ha sido atribuido a un proceso antiangiogénico. Mediante ELISA, investigamos los niveles séricos de endostatina y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en ratones nude o BALB/c portadores de tumores de pulmón humanos (Calu-6 y H460) o mamaros murinos (M3MC, M-234p y M-234m), respectivamente. La endostatina sérica en ratones con el tumor CAR+ Calu-6 (media ± ES: 8.9±0.002 ng/ml), fue mayor que la hallada en aquellos con CAR- H460 (5.9±0.2 ng/ml, p<0.001). En cambio, fueron similares en portadores de tumores mamaros CAR+ y CAR-. Contrariamente, el nivel sérico de VEGF en ratones con el tumor CAR- H460 (24.3±1.1 ng/ml) fue mayor que en aquellos con el CAR+ Calu-6 (12.5±0.3 ng/ml, p<0.001). Similarmente, los ratones portadores del tumor CAR-M-234m, mostraron valores séricos de VEGF (61.1±5.2 ng/ml) mayores (p<0.001) que los portadores de los CAR+ M3MC o M-234p (35.3±2.1 y 12.6±1.2 ng/ml, respectivamente). La inmunotinción con anti-CD31 mostró que los tumores 2arios CAR+ estaban menos vascularizados que sus tumores 1arios, mientras que esta diferencia no fue observada en los tumores CAR-. Estudios in vitro evidenciaron un efecto inhibitor del suero de animales con tumores CAR+ sobre la proliferación de células endoteliales, comparado con suero normal, mientras que el suero de animales con tumores CAR- no alteró dicha proliferación y, en algunos casos, la estimuló. El fenómeno de CAR resulta de un incremento en el cociente entre reguladores anti y proangiogénicos. Pueden variar, según los modelos, los niveles y tipos de factores involucrados pero se conserva la tendencia inhibitoria de la angiogenesis.

- 123. (3784) CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BFGF Y RFGF-1 AL 4 (RFGFS) EN EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA (GM) MURINA NORMAL Y TUMORAL.** LAMB, CAROLINE A.; LANARI, CLAUDIA; MOLINOLO, ALFREDO A.

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET

No hay estudios completos de la expresión del bFGF y RFGFs en el desarrollo de la GM murina por inmunohistoquímica. En trabajos previos demostramos que el bFGF estimula la proliferación celular tumoral. El objetivo fue investigar la expresión de bFGF y los RFGFs en el desarrollo de la GM y en 3 carcinomas mamaros por inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia. El bFGF mostró una intensa marcación en las células estromales que rodean el conducto mamarario y escasa marcación nuclear y por zonas citoplasmática en las células luminales de la GM virgen; exclusivamente citoplasmática y en la membrana luminal de las células epiteliales de los conductos y lobulillos en la GM preñada y citoplasmática en los acinos y en el estroma periductal en las GM lactantes. Los RFGF-1 y 4 sólo presentaron marcación en la GM virgen. Para el RFGF-2 la marcación fue citoplasmática y tenue en las células epiteliales y en el estroma periductal en los tres estadios. El RFGF-3 presentó una intensa marcación nuclear en las células epiteliales de GM vírgenes y preñadas y no hubo marcación en GM lactantes. En el tejido tumoral el bFGF se expresó mayormente en el estroma con marcación citoplasmática y en menor grado en el parénquima. Los RFGFs presentaron una marcación predominantemente epitelial en todos los tumores. Los RFGF-2 y 3 presentaron marcación nuclear y ocasionalmente citoplasmática. La marca fue tenue y citoplasmática para los RFGF-1 y 4. Concluimos que existe un cambio en la expresión y distribución del bFGF y sus RFGFs en los distintos estadios que podrían contribuir al desarrollo de la GM. La expresión del bFGF y de los RFGFs con predominio en el estroma y en el parénquima tumoral, respectivamente permiten hipotetizar sobre una regulación paracrina en los tumores.

- 124. (3920) MARCADORES DE SOBREVIDA EN CARCINOMA COLORECTAL. VALOR DE LAS MMPs, TIMPs Y EL SISTEMA CADERINA E- B CATENINA.** ROCA, MARÍA FERNANDA; MAURO, LAURA; LASTIRI, JOSÉ; PALLOTTA, MARÍA GUADALUPE; MORANDI, ANA; VARELA, MIRTA; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA; PURICELLI, LYDIA

Instituto de Oncología Angel H. Roffo Hospital Italiano de Buenos Aires

Durante la invasión tumoral existe una interacción entre las células tumorales y células adyacentes y matriz extracelular que está mediada por moléculas de adhesión como la Caderina E, de localización transmembrana y la β -Catenina, intracitoplasmática. El balance entre metaloproteasas (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs) es también crítico en el control de la progresión tumoral. Nuestro objetivo fue investigar los patrones de expresión de las metaloproteasas, MMP-2, MMP-7 y MMP-9 y de sus inhibidores naturales TIMP-1 y TIMP-2, además del sistema. Caderina E/ β -Catenina por técnicas de inmunohistoquímica en 86 pacientes con carcinoma de colon, vírgenes de tratamiento y con seguimiento de 5 años. El valor pronóstico de cada molécula se estudió mediante el Log Rank test y el análisis multivariado de Cox. No se encontró asociación entre la expresión de las diferentes moléculas y los parámetros clínico-patológicos (estadificación, grado de diferenciación, localización, presencia de complicaciones y tipo de invasión). La expresión de E Caderina y β -Catenina no se asociaron a ningún parámetro pronóstico. El análisis univariado mostró que la sobreexpresión de TIMP-2 y la pérdida de Caderina-E se asocian a menor supervivencia (LR test 6,3 p< 0,01 y LR test 5,3 p< 0,02 respectivamente). Se observó asociación, aunque no significativa, entre la sobreexpresión de MMP-7 y de TIMP-1 con mal pronóstico. Concluimos que la expresión de TIMP-2 y Caderina E en cáncer de colon podría ser usada como marcador independiente de pronóstico.

125. (3956) EVOLUCIÓN CARIOTÍPICA DE CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS HORMONO-DEPENDIENTES (HD) E INDEPENDIENTES (HI). FABRIS, VICTORIA; MERANI, SUSANA; LANARI, CLAUDIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Centro de Inv. en Reproducción, Fac de Medicina, UBA

Estudios citogenéticos previos realizados en el carcinoma mamario murino HD C4-HD revelaron la presencia de cuatro cromosomas marcadores: M1: Rb(1;10); M2: Rb(2;17); M3: T(4;12;5) y M4: T(Dp6;8) y un número cromosómico modal diploide (ratón normal $2n=40$). Estudios preliminares en metafases de un tumor HI mostraron un número cromosómico hipertriploide. En base a estos datos y con el objetivo de estudiar la evolución del cariotipo en la transición a la hormono-independencia, se analizaron con técnicas de bandedo G y FISH las metafases obtenidas de cultivos primarios de distintas variantes HI surgidas a partir del tumor HD. Los pasajes tempranos (menores a 7) de una variante HI mostraron un cariotipo similar al HD, con un número modal de 40 cromosomas y los marcadores M1-M4. Tres variantes HI en pasajes más avanzados (mayores a 40) presentaron números cromosómicos entre 50 y 85, y no se observaron los marcadores M1-M4. Estos tumores presentaron translocaciones que involucraban a otros cromosomas. Resultados similares se obtuvieron en otra familia de tumores (C7), donde la variante HI presentó un cariotipo diploide, el cual cambió hacia la poliploidía en un pasaje avanzado. También se observó pérdida de uno de los marcadores y adquisición de alteraciones nuevas con el aumento de los pasajes. Si bien cada tumor presentó alteraciones propias, en ambas familias se observó al cromosoma 4 en una alteración. Podemos concluir que en los pasajes tempranos de la hormono-independencia se conservan los marcadores HD, y que luego con el avance de los pasajes se pueden perder y adquirirse otros nuevos. El aumento del número de cromosomas de los tumores HI respecto a la variante HD sería consecuencia del avance de los pasajes, posterior a la adquisición de la hormono-independencia.

126. (3962) FRAGMENTACIÓN Y PÉRDIDA DE E-CADHERINA (E-CAD) DURANTE LA REGRESIÓN DE UN CARCINOMA MAMARIO PROGESTÁGENO-DEPENDIENTE. SIMIAN, MARINA; LANARI, CLAUDIA; MOLINOLO, ALFREDO

Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal, Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET

Las metaloproteasas (MMPs) no sólo son remodeladoras de componentes de la matriz, sino también modulan funciones celulares tales como la adhesión intercelular a través del clivaje de la E-cad. Hemos demostrado que durante la regresión del carcinoma mamario murino hormono-dependiente C4-HD hay un aumento de MMPs y remodelación de la matriz. El objetivo del trabajo fue investigar si el aumento de actividad proteolítica correlacionaba con la pérdida de E-cad. Se indujo regresión tumoral por tratamiento con estrógenos o antiprogéstágenos ($n=3$ / grupo) y se extirparon los tumores a las 24, 48 y 72 horas, en 3 experimentos diferentes. Estudios de inmunofluorescencia usando un anticuerpo que reconoce el extremo extracelular de E-cad revelaron la presencia de E-cad en el parénquima tumoral y no en el estroma. A las 72 hs sólo se detectaron pocas células positivas aisladas. Estudios de Western blot confirmaron la presencia de una única banda de 120 kDa en controles y ausente a las 72 horas. Por otra parte se usó un anticuerpo generado contra un epítopo intracelular de la E-cad que reveló en controles la presencia de bandas de menor peso molecular, entre ellas una de 100 y otra de 50kDa además de la de 120kDa. En los tumores en regresión se observó un aumento en los niveles de los fragmentos de menor peso molecular, y disminución de la isoforma de 120 kDa. Nuestros resultados demuestran que durante la regresión tumoral hay fragmentación y pérdida de E-cad de alto peso molecular, sugiriendo que el aumento de actividad proteolítica tendría un rol funcional durante la regresión tumoral. Resta establecer si la pérdida de adhesión intercelular está directamente asociada a la apoptosis en nuestro modelo de regresión tumoral.

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS POSTER

CARDIOLOGIA II

128. (3258) EFECTO CARDIOPROTECTOR DE LA ADAPTACIÓN A LA HIPOXIA HIPOBÁRICA CRÓNICA EN LA RATA. LA PADULA, PABLO; COSTA, LIDIA E.

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

Se ha observado una menor incidencia de infarto de miocardio en poblaciones de la altura (Hurtado, 1960; Ostadal et al, *Physiol. Rev.* 79: 635-659, 1999). Con el objeto de comprobar si la adaptación a las condiciones de hipoxia que prevalecen en la altura aumenta la tolerancia del miocardio a la isquemia, se evaluó su respuesta a la hipoxia/reoxigenación en ratas sometidas a 53.8 kPa (H) en una cámara de hipopresión durante 1, 26 y 74 semanas y en sus respectivos controles a 101.3 kPa (C). Ambos músculos papilares del ventrículo izquierdo fueron aislados, montados en cámaras con buffer Krebs a 30°C, llevados a su longitud máxima óptima de estiramiento y estimulados a 0.2 Hz en condiciones isométricas. La tensión desarrollada (TD), máxima velocidad de contracción (+T), máxima velocidad de relajación (-T), tiempo medio de relajación, tiempo a la tensión pico y tensión de reposo fueron determinados en condiciones basales y cada 10 min durante 60 min de hipoxia (95% N₂ y 5% CO₂) y 30 min de reoxigenación (95% O₂ y 5% CO₂). Las ratas sometidas a hipoxia hipobárica durante 26 semanas mostraron mayor TD, +T y -T que las C, tanto en los valores prehipóxicos como durante la reoxigenación, al fin de la cual los valores de H vs C fueron: TD (g/mm²), 2.0 ± 0.3 vs 1.1 ± 0.1 ($p = 0.023$); +T (g/mm².s), 33 ± 3 vs 18 ± 2 ($p < 0.001$); -T (g/mm².s), 21 ± 1 vs 11 ± 1 ($p < 0.001$). Esta adaptación no se alcanzó con 1 semana de hipoxia hipobárica y se perdió a las 74 semanas. Se concluye que la adaptación a la hipoxia hipobárica crónica permanente en la rata adulta aumenta la tolerancia del músculo cardíaco a la hipoxia /reoxigenación, lo cual contribuiría a explicar la cardioprotección observada en individuos de la altura.

129. (3271) COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE LOS GLÓBULOS ROJOS DE RATAS OBESAS: EFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA. HERNANDEZ, GLADIS; CINARA, LUIS; RASIA, MARTA

UNR Cátedra de Biofísica. Fac. Cs. Médicas. UNR

Los animales de la línea beta, con obesidad hipertriglicéridémica e intolerancia glucídica, respecto de la línea alfa, eumetabólica, se caracterizan por tener: a) mayor: viscosidad plasmática (VP) y sanguínea (VS); y b) eritrocitos con menor: capacidad de deformación (DE) y agregación (AE). En este trabajo se estudió el efecto de una prolongada restricción alimentaria sobre la relación entre estas variables hemorreológicas y las alteraciones metabólicas que caracterizan a la línea beta. Se utilizaron ratas machos que luego del destete se separaron aleatoriamente en dos grupos: control (C; $n=10$) alimentados ad-libitum; y restringidos (R; $n=12$) alimentados con un 30% menos de la cantidad consumida por el grupo C. Se determinó glicemia (Gli) y trigliceridemia (TG) coloriméricamente; VP y VS con un viscosímetro cono-plato; DE por filtración a través de membranas micropore y AE) midiendo la variación de la luz transmitida a través de la muestra. A los 200 días de edad los animales del grupo R, respecto del C, presentaron disminución de: peso corporal (44%; $p < 0.001$), de TG (72%; 0.001); y de Gli a los 120 minutos de una sobrecarga oral de glucosa (38%; $p < 0.01$); mientras que Gli basal no se modificó significativamente (5%). De las variables hemorreológicas sólo difirió significativamente la AE que aumentó 37% ($p < 0.01$). Las diferencias observadas en las demás variables hemorreológicas fueron: VP=0,08 mPa.s; VS = 0,32 mPa.s a Ht= 40%; y DE=0,78%). Estos resultados muestran que la restricción alimentaria limita la obesidad y la hipertrigliceridemia de las ratas beta, pero tiene poco efecto sobre la glicemia y la tole-

rancia glucídica. En cuanto a nuestro principal objetivo, la reología sanguínea, se observó una recuperación en la tendencia a la agregación eritrocitaria. Estos resultados nos conducen a concluir que la restricción calórica puede regularizar algunas variables hemorreológicas pero no aquellas controladas genéticamente o dependientes de factores controlados genéticamente.

130. (3362) PERINDOPRIL REDUCE PAI-1 Y TGF β 1 EN MIOCARDIO DE RATA ZUCKER. TOBLLI, JORGE; CAO, GABRIEL; DEROSA, GRACIELA; PIORNO, PABLO; PAGANO, PATRICIA

Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán

PAI-1 y TGF β 1 vinculados a los procesos fibróticos y regulados parcialmente por angiotensina II, están sobreexpresados en pacientes con obesidad, hipertensión y diabetes. Objetivo: evaluar posible efecto favorable de un IECA, perindopril (P), disminuyendo la acumulación de PAI-1, TGF β 1 y colágeno (COL) en un modelo de síndrome metabólico como la rata obesa Zucker (OZR) y su control magro (LZR). G1 OZR, G2 OZR + P; G3 LZR. Durante 6 meses, G2 con P 3mg/kg/día por sonda, y G1 y G3 con vehículo. Se determinó en miocardio PAI-1, TGF β 1 y COL I y III por inmunohistoquímica. G2 presentó: 1) Menor presión arterial (126.7 \pm 2 vs. 148.6 \pm 2.7 mmHg, p<0.01) que G1. Además, G2 presentó: 1) PAI-1 (3.6 \pm 0.4 vs. 13.5 \pm 1.7%, p<0.01); 2) TGF β 1 en miocitos (0.13 \pm 0.1 vs. 9.14 \pm 4.7% /área, p<0.01); intersticial (19.8 \pm 6.8 vs. 178.9 \pm 27.4 células positivas / área, p<0.01); 3) COL I (3 \pm 0.8 vs. 13.3 \pm 1% / área, p<0.01); 4) COL III (5 \pm 0.6 vs. 9.5 \pm 0.9% / área, p<0.01); y 5) COL I /COL III ratio (p< 0.01), comparado con G1. En conclusión, P controla el mecanismo fibrótico a través de la disminución de PAI-1 y TGF β 1 en miocardio y como consecuencia la acumulación de COL en este modelo.

131. (3369) DIFERENCIAS ENTRE CANDESARTAN Y ATENOLOL EN EL REMODELADO DEL CUERPO CAVERNOSO EN HIPERTENSIÓN ARTERIAL. TOBLLI, JORGE; STELLA, INÉS; MAZZA, OSVALDO; FERDER, LEÓN; INSERRA, FELIPE

Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán Instituto de Investigaciones Cardiológicas

En experimentos previos se han demostrado cambios morfológicos del cuerpo cavernoso (CC) en ratas hipertensas (SHR) respecto a su control normotenso Wistar-Kyoto (WKY). Objetivo: determinar si el control de la presión arterial (PA) es suficiente para preservar el CC en SHR n=6 c/grupo. Durante seis meses: G1 SHR; G2 SHR con candesartan (C); G3 SHR con atenolol (AT); y G4 WKY. C 7.5 mg/kg/día y AT 100mg/kg/día. CC se estudiaron con H&E; Masson's, anti-a-smooth-muscle actin y anti-Colágeno III. Se evaluó con analizador de imágenes: músculo liso CC (CSM) y vascular (VSM) en arterias de CC; 2) fibrosis CC y 3) colágeno III (COL III). SHR con C y AT presentaron similar PA (G1= 199.6 \pm 5.1* mmHg; G2= 131.3 \pm 5.5 mmHg; G3= 136.5 \pm 2.9 mmHg; G4= 123.2 \pm 3.8 mmHg; p< 0.01 * vs. el resto). No obstante, SHR con C presentaron menor: 1) CSM (G1= 12.1 \pm 3.3%*; G2= 2.5 \pm 0.7%***; G3= 5.8 \pm 1.3%; G4= 3.6 \pm 0.9%. p< 0.01 * vs. G2 y G4; p< 0.01 ** vs. G3); 2) VSM (G1= 14329 \pm 918 μ ²; G2= 8996 \pm 835 μ ² **; G3= 11751 \pm 1060 μ ²; G4= 9235 \pm 841 μ ² **. p< 0.01 * vs. G2 y G4; p< 0.05 ** vs. G3); y 3) COL III (G1= 21.2 \pm 2.6%*; G2= 8.1 \pm 1.7%***; G3= 26.7 \pm 2.1%; G4= 9 \pm 1.5%. * vs. G2 y G4 < 0.01; ** vs. G3). C mostró una significativa protección de vasos y CC en SHR causada por hipertensión arterial en SHR, más allá del control de la PA.

133. (3518) PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROGENÉISIS EN RATAS. MILER, NOEMI; MONICA, MONICA; GAVOTTO, ANTONIO; SIMES, JUAN; SPITALE, LUIS; PALMA, JOSE

Cátedra de Física Biomédica. Fac.Cs.Ms. UNC

Es conocido que el aumento del fibrinógeno plasmático produce lesiones ateroscleróticas como denudación endotelial y engrosamiento de la íntima. Por otra parte en el estado aterosclerótico el óxido nítrico(NO) produce un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) que contribuyen a la deficiencia en la relajación vascular. En este trabajo se analizó la participación del ON en ratas en un modelo experimental de aterogénesis generado por hiperfibrinogenemias (FP) inducidas por injurias múltiples (IM) por laparotomías (Lx). Se estudió ON (uM; Reacción de Griess), FP (mg/dL) y la anatomía patológica de aorta torácica (AP) por microscopía óptica en los lotes control (A), IM x 60 ds. (B) e IM x 90 ds (C). Se observó una disminución estadísticamente significativa de ON de (B) (0.69 \pm 0.04) comparado con (A) (0.82 \pm 0.10) (p<0.01), similar comportamiento fue observado al comparar (C) (0.58 \pm 0.06) con respecto a (A) (p<0.001). Al comparar (B) y (C) se observó una diferencia no significativa. Al medir FP se observó un aumento significativo en (B) (358.7 \pm 9.9) con respecto a (A) (207.0 \pm 3.0) (p<0.001), cuando se comparó (C) (406.85 \pm 8.9) con (A) FP incremento significativamente (p<0.001). Al comparar (B) con (C) se observó un aumento significativo (p<0.001). En los lotes (B) y (C) se observa denudación endotelial y engrosamiento intimal, siendo mayor el grado de lesión en (C) con respecto a (B) (p<0.003). Estos resultados sugieren que las lesiones observadas, por hiperfibrinogenemias inducidas, presentes en nuestro modelo, se acompañan de disminución de NO y sus metabolitos por lo cual la res puesta vasodilatadora de la pared vascular estaría modificada con repercusión en el balance hemostático endotelial.

134. (3547) ACTIVIDAD DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA RENAL Y VASCULAR EN RATAS CON BAJO APORTE DE ZINC DURANTE EL CRECIMIENTO. TOMAT, A; COSTA, MA; WEISSTAUB, A; JAUREGUI, A; MAMBRIN, C; BALASZCZUK, AM; ARRANZ, C

Cátedra de Fisiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. IQUIMEFA-CONICET

El Zinc sería esencial para la actividad de la óxido nítrico sintasa (ONS) involucrada en la regulación de la función renal y la presión arterial. Objetivo: Estudiar los cambios en la actividad de la ONS y en la presión arterial sistólica (PAS) en dos grupos de ratas recién destetadas con: Dieta control (DC: 30 ppm Zinc) y Dieta baja (DB:8 ppm Zinc). Cada quince días y durante dos meses se determinó la PAS, el contenido de Zinc en plasma, orina y heces, y la excreción urinaria de nitratos y nitritos (NOx). Los animales se sacrificaron y se determinó la actividad NADPH-diaforasa en aorta torácica y la actividad de ONS con L-[U14C]-arginina luego del agregado de carbaolol (1 μ M) en aorta y riñón. Luego de 60 días del destete los animales DB presentaron menores niveles de Zinc (μ g/dl) en plasma (0días: DC: 182 \pm 5 vs DB: 179 \pm 5; 60 días: DC: 205 \pm 12 vs DB: 135 \pm 11*), orina (0 días: DC: 1.4 \pm 0.1 vs DB: 1.5 \pm 0.1; 60 días: DC: 15.4 \pm 1.5 vs DB: 8.8 \pm 2.0*) y heces (μ g)(0 días: DC: 3.3 \pm 0.2 vs DB: 3.5 \pm 0.2; 60 días: DC: 4.71 \pm 0.40 vs DB: 0.87 \pm 0.42*) y una mayor PAS con respecto al grupo DC. En el grupo DB la actividad de ONS disminuyó (Médula renal: DC: 661.07 \pm 5.93 vs DB: 501.75 \pm 10.54&; Corteza renal: DC: 510.06 \pm 5.29 vs DB: 403.84 \pm 9.08&; Aorta: DC: 383.95 \pm 18.51 vs DB: 281.43 \pm 10.16&). En el grupo DB la actividad NADPH-d fue menor que en el grupo DC en endotelio (DO: DC = 0.230 \pm 0.006 vs DB= 0.145 \pm 0.002&) y en el músculo liso vascular (DO: DC=0.185 \pm 0.004 vs DB=0.112 \pm 0.004&).&p<0.001,*p<0.01 vs DC.

	PAS (mmHg)				NOx (nmol/ml. min.100g) 0d				
	15d	30d	45d	60d	15d	30d	45d	60d	
DC	105 \pm 4	114 \pm 4	124 \pm 5	124 \pm 2	0.89 \pm 0.20	1.66 \pm 0.41	1.35 \pm 0.08	1.22 \pm 0.08	1.26 \pm 0.12
DB	114 \pm 4	131 \pm 3*	139 \pm 3*	149 \pm 3*	0.77 \pm 0.15	0.66 \pm 0.18*	0.35 \pm 0.12*	0.53 \pm 0.12*	0.58 \pm 0.11*

La disminución en la actividad renal y vascular del sistema del ON sería uno de los mecanismos involucrados en el aumento de la presión arterial observado en la deficiencia de zinc durante el crecimiento.

135. (3574) EL 5-HIDROXIDECANOICO (HD), BLOQUEANTE DE LOS CANALES MITOCONDRIALES DE POTASIO SENSIBLES AL ATP (K-ATPM) NO REVIERTE TODOS LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PI). MARINA PRENDES, MARÍA GABRIELA; GARCÍA, GIMENA; FERNÁNDEZ, ALEJANDRA; PERAZZO, JUAN CARLOS; SAVINO, ENRIQUE; VARELA, ALICIA

Cátedras de Fisiología y de Fisiopatología. Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA e IQUIMEFA-CONICET.

El PI mejora la recuperación funcional y preserva la viabilidad celular de corazones perfundidos Langendorff sometidos a isquemia global (I) 25 min - reperusión (RP) 30 min, provenientes de ratas alimentadas (AL) o ayunadas (AY) 24 h, siendo sus efectos más manifiestos en AL. Este efecto protector se acompaña de una preservación del glucógeno tisular y de una menor acumulación de lactato durante la I. El HD (100µM, agregado al medio de perfusión 5 min antes del PI), que bloquea los canales K-ATPM, revierte la protección funcional del PI (3 min I-5 min RP previos a la I sostenida). El objetivo del trabajo fue investigar si el HD revierte los efectos metabólicos y citoprotectores del PI. Para ello se midió el contenido tisular de glucógeno (n=6) y de lactato (n=6) y se midió el porcentaje de viabilidad celular (%VC) con el método del trifeniltetrazolio y morfometría computarizada (n=5). La estadística se hizo con ANOVA. Al finalizar la I sostenida el contenido tisular de lactato de los corazones precondicionados no fue modificado por el HD (AY: 76,58±8,62 vs 71,45±9,37, AL: 88,27±18,42 vs 95,29±10,51 µmol/g seco), pero el contenido de glucógeno disminuyó en presencia del bloqueante (AY: 58,36±15,35 vs 154,68±36,02, AL 91,33±19,28 vs 184,49±31,26 µg/100mg seco, p<0,05). La preservación de la viabilidad celular observada en corazones precondicionados no fue afectada por el HD (%VC: AY: 64,1±8,48 vs 47,85±8,87, AL 57,57±10,57 vs 60,49±8,06). Los resultados sugieren que en este modelo experimental, el bloqueo de los canales K-ATPM, si bien revierte los efectos beneficiosos del PI sobre la funcionalidad cardíaca y la preservación del glucógeno celular, no afecta los mecanismos implicados en la preservación de la viabilidad celular y la inhibición de la glucólisis anaeróbica.

136. (3591) EL BLOQUEO DEL INTERCAMBIADOR NA/H (ENA/H) NO AFECTA LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL DEL CORAZÓN SOMETIDO A ISQUEMIA GLOBAL (I)-REPERFUSIÓN (RP) PROVENIENTE DE RATAS AYUNADAS (AY). MARINA PRENDES, MARÍA GABRIELA; GARCÍA, GIMENA; TESTONI, GUSTAVO; SAVINO, ENRIQUE; VARELA, ALICIA

Cátedra de Fisiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA e IQUIMEFA-CONICET.

El ayuno previo, que activa el catabolismo lipídico acelera la recuperación funcional en corazones de rata perfundidos Langendorff sometidos I-RP y disminuye la glucólisis anaeróbica durante la I. Los efectos protectores del ayuno podrían entonces deberse a una menor acidificación intracelular que produce una menor activación del ENa/H y consecuentemente una menor sobrecarga de Ca a través del intercambiador Na/Ca. El objetivo fue comparar los efectos del dimetilamilorida (DMA), inhibidor del ENa/H, en corazones provenientes de ratas AY 24 h con los ejercidos en corazones de ratas alimentadas (AL) sometidas a I (25 min)-RP (30 min). El DMA 10 µM fue agregado al medio de perfusión 10 min antes de la I hasta los 3 min de RP. La contractilidad se evaluó mediante el producto presión sistólica x frecuencia (Px F), las derivadas de la contracción y la relajación (±dP/dt) y la presión diastólica final (PDF). La estadística se hizo con ANOVA de 3

factores (n=8). El DMA mejoró la recuperación en AL (P<0.01) y no la afectó en AY (Px F: AL: 66±11 vs 17±7%, AY: 82±13 vs 90±14%, +dP/dt: AL 91±12 vs 27±8, AY 106±16 vs 120±8, -dP/dt: AL: 89 ±8 vs 31±9, AY 101±14 vs 108±15%, a los 30 min de RP). No modificó la contractura isquémica en AL, pero la aumentó en las AY (52±8 vs 10±5% a los 25 min de I, p<0,05). Este estudio confirma los efectos beneficiosos del bloqueo del ENa/H en AL y demuestra que dicho bloqueo no afecta la recuperación funcional en AY, eliminando las diferencias entre ambos grupos. Los resultados sugieren que el efecto protector del ayuno previo sería consecuencia de una menor actividad del ENa/H debido a la menor acidificación intracelular. El aumento de la contractura isquémica observada en AY en presencia de DMA no se puede explicar con los datos del presente estudio.

ENDOCRINOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN IV

137. (3254) ANOMALÍAS PLACENTARIAS Y EMBRIONARIAS PRODUCIDAS POR EL ENTORNO DIABÉTICO MATERNO. PUSTOVRH, MARÍA CAROLINA; ORTÍZ, MARÍA ELENA¹; LÓPEZ, JUAN JOSÉ²; JAWERBAUM, ALICIA; GONZÁLEZ, ELIDA

Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO) ¹ U. Reproducción y Desarrollo PUC, Chile. ²Inst. "Prof. E. De Robertis". Fac. de Medicina, UBA

El desarrollo placentario y fetal se encuentra profundamente alterado en la gesta diabética. Nuestros estudios previos han identificado anomalías en los procesos de implantación y morfogénesis embrionaria, relacionadas con alteraciones en los niveles y regulación del óxido nítrico y las metaloproteasas. Sin embargo resulta poco clara la incidencia de la contribución materna y/o fetal en dichos cambios. Objetivo: Evaluar mediante experiencias de transferencia embrionaria la influencia del entorno diabético materno sobre el desarrollo de las anomalías placentarias y fetales. Metodología: Embriones de ratas sanas en día 5 de preñez fueron transferidos a ratas sanas (TC) o diabéticas (TD) seudopreñadas químicamente. Al día 14 de preñez se determinó el número, crecimiento y morfología de los embriones implantados. Resultados: La evaluación de las transferencias embrionarias mostró que el número de embriones implantados en las receptoras diabéticas (60%) fue significativamente menor que en receptoras sanas (86%) p <0.05. El grado de reabsorción embrionaria aumenta en las receptoras diabéticas encontrándose reducida la tasa de embriones viables (52%) en relación al control (84%). La evaluación morfométrica del los fetos de TD y TC no presentó diferencias, pero el órgano placentario de TD fue significativamente mayor que el de TC p<0.001. Los resultados de las transferencias embrionarias evidencian que alteraciones debidas exclusivamente al metabolismo materno condicionan el normal desarrollo de la gesta, traduciéndose en cambios de la unidad fetoplacentaria, a la vez que sugieren la utilidad de este modelo experimental en posteriores estudios sobre la influencia del entorno diabético materno sobre el desarrollo placentario y fetal.

138. (3257) REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE NO Y PGE2 EN EL EMBRIÓN DE RATA DIABÉTICA DURANTE LA ORGANOGÉNESIS TEMPRANA. HIGA, ROMINA; JAWERBAUM, ALICIA; WHITE, VERÓNICA; PUSTOVRH, CAROLINA; CAPOBIANCO, EVANGELINA; GONZALEZ, ELIDA

CEFYBO Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos

En el embrión de rata en etapa de organogénesis temprana se expresan los receptores nucleares PPARdelta y el factor nuclear kappa B (NFkappaB). La diabetes induce dismorfogénesis mediante mecanismos que involucran alteraciones en los niveles embrionarios de NO y de PGE[2]. Con el objeto de estable-

cer si PPARdelta y NFkappaB modulan la producción de NO y PGE[2] embrionaria se estudia el efecto de carboxiprostaciclina (cPGI[2]), análogo estable de PGI[2] y de PGA[1], ambos activadores de PPARdelta; y de SN50 (inhibidor de translocación nuclear de NFkappaB) sobre los niveles de nitratos/nitritos (índice de la producción de NO, dosados por reacción de Griess) y la producción de PGE[2] (RIA) en embriones de rata sana (ES) y diabética (ED) obtenida por administración neonatal de estreptozotocina. Resultados: Los niveles de nitratos/nitritos (mmol/mg) son mayores en ED (74+8, $p<0.001$) en relación al control (28+4). La adición de ambos activadores de PPARdelta y de inhibidores de NFkappaB no modifican dichas concentraciones. Los niveles de PGE[2] (pg/ug prot) están incrementados en ED (19+1.4, $p<0.02$) en relación al control (13+1.7) y dichas concentraciones no se modifican en presencia del inhibidor de NFkappaB. La adición de cPGI[2] estimula la producción de PGE[2] en EC (51+14 $p<0.02$) y en ED (94+18, $p<0.001$). La adición de PGA[1] estimula aún más la síntesis de PGE[2] en EC (186+30, $p<0.001$) y ED (696+50, $p<0.001$). En el embrión en organogénesis, la activación de NFkappaB no parece mediar la síntesis de NO y PGE[2]. Los agonistas de PPARdelta modulan positivamente la síntesis de PGE[2], y por lo tanto la alteración de los niveles endógenos de PPARdelta y/o de sus agonistas podrían estar involucrados en la producción anómala de PGE[2] que afectan al embrión de ratas diabéticas.

139. (3443) MECANISMO DE ACCIÓN DE ESTRONA EN TEJIDO VASCULAR DE RATAS CON Y SIN ACTIVIDAD OVÁRICA. SELLES, JUANA; POLINI, NELIDA; BENOZZI, SILVIA; ALVAREZ, CRISTINA; MASSHEIMER, VIRGINIA

Cátedra de Análisis Clínicos II. Dto Biología Bioquímica y Farmacia Universidad Nacional del Sur

El mecanismo de vasorelajación arterial es dependiente de NO e implica la participación de los sistemas PI[3]K/Akt y la regulación de canales iónicos(K(+)) y/o Ca(++) vía PKA o PKC. Previamente hemos demostrado que en tejido arterial la estrona (E[1]) estimula la síntesis de NO. En presente trabajo se estudió el mecanismo involucrado en esta respuesta. Anillos de aorta de ratas hembras, se trataron "in vitro" con concentraciones fisiológicas de E(1) (1-10 min.) El tratamiento con E[1] 0.1 nM activa a las enzimas fosfolipasa A[2]e incrementa la producción de ácido araquidónico y a la COX aumentando la liberación de PGI[2] y TX al medio de incubación (80% y 85% sobre el control respectivamente). Se midió la actividad COX en presencia de wortmanin 100 nM (inhibidor de PI[3]K). Los incrementos en PGI[2] inducidos por la E[1] no fueron afectados por el inhibidor, sugiriendo que la vía PI[3]K no participa en la activación de COX por parte de E[1]. Se estudió la acción de E[1] sobre la actividad PLC. E[1] aumenta significativamente la síntesis de DAG entre los 5 y 10 min. de tratamiento. Los resultados descriptos fueron obtenidos empleando ratas fértiles. En ratas ovariectomizadas (OVX), se pierde el estímulo de la E[1] sobre la producción de NO (1.05 vs2.08; 1.14 vs 1.23 nmolNO/mg prot. control vs E[1], fértiles y OVX). La administración de estradiol a las ratas OVX, recupera el efecto de E1 (8% vs 86% sobre control OVX vs OVX+E2). Estos resultados sugieren que la acción de la estrona en tejido vascular es dependiente de estradiol e involucra a PLA[2]; COX; NOS y PLC.

140. (3566) EFECTOS DE UNA BIGUANIDA EN UN MODELO MURINO DE SINDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO. LUCHETTI, CAROLINA; SANDER, VALERIA; GUTIERREZ, MARIANA; ELIA, EVELIN; CHIOCCIO, SARA; CREMASCHI, GRACIELA; DI GIROLAMO, GUILLERMO; GONZALEZ, CLAUDIO; MOTTA, ALICIA

Laboratorio de Fisiopatología Ovárica-CEFYO (CONICET) Instituto de Neurobiología (IDNEU) Facultad de Medicina, Departamento de Farmacología-UBA

El Síndrome del Ovario Poliquístico (PCOS) se caracteriza por hiperandrogenismo junto con desórdenes endócrinos y un alto in-

dice de ciclos anovulatorios. La metformina (biguanida) es una de las drogas orales más utilizadas en el tratamiento de PCOS. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el rol de metformina (M) en la regulación ovárica en PCOS. Para ello se utilizaron ratones BALB/c hembras prepúberes con PCOS inducida por androgenización con dehidroepiandrosterona (DHEA 6 mg/Kg, s.c. diariamente). Otro grupo de animales fue tratado con DHEA y M (50 mg/Kg, oral diariamente). A los 20 días de tratamiento el análisis histológico mostró que el grupo DHEA presentaba formación de quistes ováricos, incrementada infiltración linfocitaria y mayor proporción de tejido estromal con respecto a los controles (inyectados con vehículo). La M revirtió en parte el deterioro tisular observado, disminuyó la concentración de estradiol (DHEA=1100±184 vs DHEA+M=500±118 pg/ml suero) y no modificó los niveles de progesterona (DHEA=4±2 vs DHEA+M=4±2 ng/ml suero) ambos cuantificados por RIA. La M no modificó la producción de glucosa (glucosa oxidasa-peroxidasa): DHEA=110±37 vs DHEA+M=120±45 mg/dl suero. Los animales fueron cicladados durante el período de tratamiento, resultando al día 20: el 60% del grupo DHEA en estro y el 40% en metaestro, mientras que en el grupo DHEA+M esta relación se invirtió presentando un 57% en metaestro y un 43% en estro. Concluimos que en este modelo murino de PCOS, los niveles elevados de andrógenos (DHEA) y estradiol serían responsables de la aparición y mantenimiento de quistes ováricos. El tratamiento con metformina restauró parcialmente la integridad del tejido ovárico y revirtió los niveles séricos de estradiol anormalmente aumentados.

141. (3599) REABSORCIÓN EMBRIONARIA DURANTE LA PREÑEZ EN EL SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO. SANDER, VALERIA; LUCHETTI, CAROLINA; SOLANO, MARÍA EMILIA; LA ROSA, ISABEL; BACHMANN, SANDRA; DI GIROLAMO, GUILLERMO; GONZALEZ, CLAUDIO; MOTTA, ALICIA

Laboratorio de Fisiopatología Ovárica, CEFYO, CONICET Facultad de Medicina, Departamento de Farmacología, UBA

El Síndrome del Ovario Poliquístico (PCOS) se caracteriza por hiperandrogenismo junto con desórdenes endócrinos y alto índice de infertilidad. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si el hiperandrogenismo afectaba o no el proceso de implantación embrionaria. Se utilizaron ratones BALB/c preñados con PCOS inducida por dehidroepiandrosterona (DHEA, s.c.: 6 mg/Kg). Dado que la implantación en ratón se produce en el día 5, se utilizaron dos modelos murinos: 1.-Post-implantación ó DHEA-2: en ratones preñados se inyectó DHEA en los días 6 y 7 de preñez, 2.- Pre-implantación ó DHEA-6: se inyectó DHEA en los días 2 a 7 de preñez. Los controles (C2 y C6) se inyectaron con vehículo: aceite. Los animales fueron sacrificados en el día 8 de preñez. En los ovarios se determinaron: i) reabsorción embrionaria (RE) por histoquímica y ii) prostaglandina E (PGE) por radioinmunoensayo (RIA). En los sueros se evaluaron por RIA los niveles de progesterona (P) y estradiol (E). Resultados: el grupo DHEA-2 presentó un 40% de RE mientras que DHEA-6 el 100%. La P disminuyó en los ratones PCOS (controles= 46±2 ng/ml, DHEA-2= 23±3 y DHEA-6= 14±3 ng/ml suero). Asimismo el E que fue no detectable en los controles aumentó en PCOS: DHEA-6= 1240±80 pg/ml suero y DHEA-2= 726±70 ng/ml. La PGE ovárica aumentó en animales con PCOS (controles= 135±9, DHEA-2=566±29;DHEA-6= 246±59). Concluimos que el tratamiento de androgenización más prolongado produciría una mayor RE que se vio acompañada con un mayor descenso de P y con un aumento de E y PGE, que serían responsables de un proceso inflamatorio que disminuiría la funcionalidad ovárica.

142. (3636) EFECTO DE LOS ÉSTERES DE FORBOL (PMA) SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNA STAR INDUCIDAS POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF) EN CÉLULAS DE LEYDIG TUMORALES MA-10. PATRIGNANI, ZORAIDA;

MARAZITA, MARIELA; MONDILLO, CAROLINA; RECHE, CECILIA; PIGNATARO, OMAR

Instituto de Biología y Medicina Experimental Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales. IByME-CONICET.

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que el EGF aumenta la respuesta esteroidogénica en células de Leydig a través de un aumento en la expresión de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR). Por otra parte, si bien el PMA (potente activador de PKC) ha sido involucrado en la esteroidogénesis, los resultados no han sido concluyentes. Objetivo: Caracterizar la acción del PMA sobre la respuesta esteroidogénica y expresión de StAR en células MA-10. Estudiar los efectos de este factor sobre las respuestas inducidas por EGF. Métodos: La producción de esteroides fue medida por RIA y la expresión de StAR evaluada por Western Blot. Resultados: El PMA produjo un aumento dependiente de la dosis en la esteroidogénesis basal (dosis máxima: PMA 1 μ M: 1,5-10 veces de estimulación respecto control). Además, el PMA potenció los efectos de dosis submáximas de un análogo de AMPc (veces respecto C: dbAMPc 0,1mM: 32,6 \pm 3,3; PMA 1 μ M: 1,5 \pm 0,3; dbAMPc + PMA: 62,7 \pm 9,3 p<0,001 vs dbAMPc). El PMA también potenció la esteroidogénesis inducida por EGF (veces respecto C: EGF 10ng/ml: 5,8 \pm 0,8; PMA 1 μ M: 1,8 \pm 0,9; EGF+PMA: 32,7 \pm 5,4 p<0,001 vs EGF). También se realizaron experimentos preincubando 30 min con el éster de forbol y luego con EGF solo. Se obtuvieron resultados similares a los descriptos. Los efectos sobre esteroidogénesis se correlacionaron con incrementos sobre la expresión de StAR tanto sobre los niveles basales como los inducidos por dbAMPc o EGF. Conclusión: En células MA-10, el PMA (probablemente por activación de PKC) regula positivamente la esteroidogénesis y potencia la acción del EGF a través del aumento en la expresión de proteína StAR. (Subsidios: ANPCYT, CONICET, CIC y Beca Carrillo-Oñativía)

143. (3644) EVIDENCIAS DE SINERGISMO A NIVEL NO GENÓMICO ENTRE EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (ER) Y EL RECEPTOR DE ARILOHIDROCARBUROS (AHR) SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA (GC) DE RATA . BUSSMANN, URSULA; BUSSMANN, LEONARDO; BARAÑO, LINO

IByME Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Se ha descrito la presencia del AhR en GC de rata y demostrado que su delección produce infertilidad en otras especies. Paradójicamente, ligandos de este receptor como las dioxinas producen alteraciones reproductivas. En la búsqueda de efectos de distintos ligandos del AhR sobre la función de GC de rata, hemos hallado que β -Naftoflavona (β -NF), agonista del AhR, posee un efecto comitogénico con el estradiol (E2) en presencia de FSH en cultivos de GCs. Los objetivos de este trabajo fueron determinar si este efecto está mediado por el ER y por el AhR, y evaluar si dicho sinergismo se produce a nivel transcripcional. Para esto, se estudió los niveles de proliferación por incorporación de timidina en cultivos de GCs estimuladas con FSH (2 ng/ml), E2 (100 ng/ml) y β -NF (20 μ M) en presencia del antagonista del ER ICI (10 μ M) o del AhR, alfa-NF (10 μ M). Además, se sobreexpresó transientemente en GC el AhR y luego de tratar con β -NF se evaluó por inmunofluorescencia (IF) los niveles de expresión de Ciclina D2. Por otro lado, se analizó por medio de ensayos de transfecciones transientes el efecto de β -NF sobre la transcripción de un gen reportero que se halla bajo un promotor que posee elementos de respuestas para el ER. El efecto comitogénico de β -NF y E2 (3740 \pm 46 cpm/well vs. 2438 \pm 74 cpm/well en el grupo FSH+E2) fue totalmente inhibido por ICI: 708 \pm 27 cpm/well (p<0.001). Similarmente, dicho sinergismo fue completamente suprimido por alfa-NF: 461 \pm 22 cpm/well vs. 1103 \pm 37 cpm/well en el grupo FSH+E2+ β -NF (p<0.001). Además, se observó por IF para Ciclina D2 que el efecto comitogénico de β -NF con

E2 es mayor en células que sobreexpresan el AhR. Por otro lado, β -NF inhibió la expresión del gen reportero inducida por E2. Estos resultados indican que el efecto comitogénico que ejerce β -NF y E2 en GCs de rata está mediado por el AhR y por el ER, y que este sinergismo no se verifica a nivel transcripcional.

144. (3772) PARTICIPACIÓN DE LAS PROSTAGLANDINAS (PGS) DEL ÚTERO Y LA DECIDUA EN LA REABSORCIÓN EMBRIONARIA MURINA INDUCIDA POR LIPOPOLISACARIDO (LPS). AISEMBERG, JULIETA; OGANDO, DIEGO; RIBEIRO, MARÍA LAURA; CELLA, MAXIMILIANO; FRANCHI, ANA MARÍA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos - CONICET

Hemos observado que dosis relativamente bajas de LPS que no ponen en riesgo la supervivencia materna, producen altos porcentajes (90-100%) de reabsorción embrionaria con expulsión fetal durante la preñez temprana en ratón. En la inducción de este aborto séptico el óxido nítrico (NO) es un mediador fundamental, su producción se ve incrementada en útero y decidua, con un máximo a las 6 hs post-inyección y un inhibidor de su síntesis (aminoguanidina, AG) es capaz de revertir la reabsorción embrionaria. En numerosos eventos reproductivos el NO es capaz de interactuar con la ciclooxigenasa (COX), enzima encargada de la síntesis de PGs. Nuestro objetivo fue caracterizar la participación de las PGs en este modelo estudiando su producción en los sitios de implantación de ratones tratados con LPS cuando los niveles de NO son máximos. Hembras Balb/c en el día 7 de preñez se trataron con LPS (1 μ g/g peso, ip), LPS + AG (6mg/ratón) y fueron sacrificadas 6 hs después. La AG fue capaz de modificar el incremento de PGs debido al LPS sólo en útero (PGE: C: 2358 \pm 415 pg/mg ph; LPS: 5898 \pm 1087, LPS+AG: 2615 \pm 1000; PGF2a: C: 2034 \pm 475; LPS: 3918 \pm 643, LPS+AG: 2459 \pm 271). Se incubaron úteros y deciduas in vitro con inhibidores de las COX: Indometacina (10(-6)M), Meloxicam (10(-7)M) y NS-398 (30ng/ml). En decidua el LPS aumenta la síntesis de PG (PGE: 17100 \pm 842 vs 9469 \pm 150 y PGF2a:3659 \pm 121 vs 2788 \pm 52), la indometacina y el NS-398 revierten el efecto del LPS. En útero se observa un fenómeno similar. La administración in vivo de un inhibidor selectivo de la COX-2 revierte la reabsorción embrionaria inducida por LPS. En la reabsorción embrionaria murina inducida por LPS los niveles de PG aumentan por la acción sobre la COX-II mientras que en útero el aumento de las PGs estaría modulado por el NO.

145. (3906) SENSIBILIDAD DIFERENCIAL AL ESTRÉS Y A LOS ESTEROIDES OVÁRICOS DE LAS RATAS HIPOPROLACTINÉMICAS OFA HR/HR COMPARADAS CON LAS SPRAGUE DAWLEY, SU CEPAS DE ORIGEN. VALDEZ, SUSANA R.; DEIS, RICARDO P.; JAHN, GRACIELA A.

Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU CONICET

Las ratas OFA hr/hr, derivadas de Sprague Dawley (SD), son hipoprolactinémicas y con lactancia deficiente relacionada con alteraciones en el eje dopaminérgico y sensibilidad al estrés aumentada con respecto a las Wistar. Comparamos la respuesta al estrés de las ratas OFA y SD en distintos ambientes hormonales. Usamos hembras en ciclo (P, E, D1, D2), día 19 de preñez (G19), día 11 de lactancia (L), ovariectomizadas (OVX), OVX más estrógeno (OVXEg, 5 μ g), OVX más progesterona (OVXPg, 5 mg x 2), OVXEgPg y machos con y sin Eg. El estrés se provocó por traslado a una sala contigua al bioterio, exposición a 2 min. de éter y sangría por vena caudal (S1), y una segunda sangría 5 min. después (S2). Se midió PRL por RIA. En E los niveles basales de PRL fueron altos y el estrés aumentó más la PRL en SD (Co 37 \pm 7 ng/ml, S1 297 \pm 42, SD S2 210 \pm 32) que en OFA (Co 34 \pm 8, S1 68 \pm 13, S2 176 \pm 38). En P, D1 y D2 la respuesta fue similar en ambas cepas. En G19 y L el estrés aumentó PRL en OFA (G19 Co 5.5 \pm 1.7, S2 13.6 \pm 2.8 y L Co 2.6 \pm 0.5, S2 24 \pm 4)

pero no en SD. En ambas cepas la OVX redujo la respuesta en forma similar. Las SD OVXEg presentaron basales altos y respondieron más al estrés que las OFA (SD Co 108±26, S1 280±68, S2 143±34; OFA Co 17±4, S1 45±13, S2 87±16). La OVXPg inhibió la respuesta al estrés en ambas cepas. En OVXEgPg se encontraron niveles basales más bajos en las dos cepas y se inhibió la respuesta al estrés en SD pero no en OFA. Los machos con y sin Eg tuvieron respuesta similar en ambas cepas. Las ratas OFA responden menos al Eg que las ratas SD. La respuesta al estrés pareció ser de menor intensidad pero más prolongada y Pg inhibió menos la respuesta en las OFA, sugiriendo mayor sensibilidad al estrés en esta cepa, enmascarada por la menor respuesta en PRL

146. (3970) LA PROGESTERONA INHIBE LA INDUCCIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS) EN MACRÓFAGOS ACTIVADOS CON LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS). POSIBLE PAPEL PROTECTOR DURANTE LA PREÑEZ. SILBERMAN, DAFNE MAGALI; CELLA, MAXIMILIANO; GENARO, ANA MARÍA; FRANCHI, ANA MARÍA

Cat. Radioisótopos. Fac. Farmacia y Bqca. UBA CEFYBO-CONICET

El óxido nítrico (NO) es uno de los mediadores más importantes que participan en la cascada de eventos que llevan a la muerte durante el shock endotóxico. Los macrófagos (M) son los principales generadores de NO durante este proceso. Recientes evidencias basadas en la diferente susceptibilidad a la sepsis después de injuria severa en relación a la edad y al sexo sugieren que los esteroides pueden disminuir la respuesta inflamatoria al trauma. El objetivo de este trabajo fue estudiar la acción de la progesterona (P) sobre la producción de NO (reacción de Griess) y la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) (formación de (14)C-citrulina) en M peritoneales de ratones BALB/c y la posible modulación de la síntesis de NO en M por P durante la preñez. Observamos que la incubación con P inhibió completamente la inducción de la NOS por LPS in vitro en M (basal: 2.2±0.4 pmol/10(6) cél., LPS: 6.6±0.8, LPS+P: 1.2±0.6). Los M provenientes de animales inyectados con P (2mg/kg) no respondieron al estímulo con LPS in vitro (basal: 5.9±0.7, LPS: 4.5±0.5). Resultados similares se observaron en M de hembras preñadas (día 15 de gestación). La administración in vivo de LPS (3.2 mg/kg) indujo una actividad de la NOS que fue significativamente mayor en los M provenientes de hembras no preñadas (control) respecto de los de hembras preñadas (control: 27.7±0.3, preñada: 4.8±0.5). Las curvas de letalidad realizadas para un rango de dosis de LPS de 1.6-4.0 ug/kg en función del tiempo mostraron una mayor susceptibilidad en la hembras control respecto de las preñadas (p<0.05). Estos resultados muestran que la P inhibe la inducción de NOS sugiriendo un papel protector de esta hormona en respuesta a la endotoxemia durante la preñez.

147. (4013) ESTUDIOS PRELIMINARES DEL GEN DE LA INHIBINA ALFA (INHAlFA) EN PACIENTES CON FALLA OVÁRICA PREMATURA (POF). SUNDBLAD, VICTORIA; CHIAUZZI, VIOLETA A.; DAIN, LILIANA; CHARREAU, EDUARDO H.

Instituto de Biología y Medicina Experimental Centro Nacional de Genética Médica (ANLIS) Bs. As., Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA.

La falla ovárica prematura (POF) es un síndrome heterogéneo de etiología desconocida en muchos casos. En estudios previos no hallamos mutaciones en el gen del receptor de FSH y observamos que los polimorfismos presentes no explicarían el desarrollo de esta enfermedad. Por otro lado, alteraciones en la glicoproteína inhibina podrían conducir al desarrollo de POF debido a su rol en la regulación negativa de la secreción de FSH hipofisiaria. Existen dos formas de inhibina: A (alfa-βA) y B (alfa-βB); el homodímero βA-βB es la activina. En la peri-menopausia, la disminución observada en la relación inhibina/activina proba-

blemente se deba al déficit en la producción de la subunidad alfa. Así, el desarrollo de POF podría ser consecuencia de mutaciones en el gen INHAlfa que causaría una disminución en la cantidad de inhibina bioactiva, conduciendo a una depleción prematura de folículos ováricos debido al aumento de la concentración de FSH. El objetivo de nuestra investigación es estudiar el gen INHAlfa como posible causante de POF idiopático. En el presente trabajo se analizó el polimorfismo C129T de la región 5' UTR en ADNs provenientes de 22 pacientes POF de etiología desconocida y 44 controles. La región de interés fue amplificada por PCR y el fragmento de 240 pb fue digerido con la enzima SpeI. Las frecuencias alélicas halladas fueron: Control: 0.716 C y 0.284 T; POF: 0.818 C y 0.181 T. Si bien las diferencias encontradas entre los grupos no resultaron estadísticamente significativas (X(2)= 1.64; p=0.2), las frecuencias alélicas son similares a las descriptas por otros autores quienes, estudiando una población mayor, sí observan diferencias significativas. Hasta el presente, nuestros resultados no estarían indicando una asociación entre el polimorfismo C129T y la ocurrencia de POF idiopático.

148. (4025) LA MULTIPARIDAD INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE FACTORES CAPACES DE PREVENIR EL ABORTO. JUNOVICH, G; DUBINSKY, V; GENTILE, T; MARGNI, R; GUTIERREZ, G

IDEHU - FFYB, Universidad de Buenos Aires

Niveles normales de IL-6 placentaria son capaces de prevenir el aborto mediado por factores inmunológicos. Dentro de los mecanismos protectores postulados se encuentra su capacidad de incrementar el porcentaje de anticuerpos bloqueantes (asimétricos). La producción de ambas moléculas se encuentra afectada en la preñez anormal del modelo abortador CBA/J x DBA/2 con respecto a la cruce control CBA/J x BALB/c. Por otra parte, se ha demostrado que la principal fuente de IL-6 durante la gestación la constituyen los macrófagos, mientras que la presencia de estas células en la placenta murina se incrementa con el grado de paridad. Mas aún, el sobrenadante de cultivo de placentas proveniente de hembras múltiparas es capaz de incrementar la producción de anticuerpos IgG asimétricos in vitro. A partir de estos antecedentes, el presente estudio intenta demostrar la influencia del grado de paridad sobre la producción de IL-6 y de IgG asimétrica en placentas CBA/J x DBA/2, y su consecuencia sobre el índice de pérdidas fetales. Para ello se han cuantificado los niveles de ambas moléculas por ELISA en cultivos de explantos placentarios provenientes de hembras múltiparas y primíparas de la cruce abortadora y control, al día 9.5 de la gestación (día en que culminan los eventos que conducen a la pérdida fetal). Los resultados obtenidos demuestran que las placentas de hembras múltiparas producen significativamente mayores niveles de IL-6 y de IgG asimétrica, con respecto a primíparas de la misma cruce (2510 y 271pg/mL/g IL-6, 64 y 44% IgG asimétrica), mientras que el índice de pérdidas fetales en la cruce CBA/j x DBA/2 bajó de 25% en primíparas a 0% en múltiparas. Estos datos sugieren que la multiparidad es capaz de inducir la síntesis de factores capaces de prevenir el aborto.

GENÉTICA II

149. (3851) PATRONES ATÍPICOS DE SEÑALES DETECTADOS POR FLUORESCENCIA IN SITU HIBRIDIZATION EN INTERFASE (FISH-I) EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC). GARGALLO, PATRICIA; CUELLO, MARIA TERE-SA; LARRIPA, IRENE

Departamento de Genética. Academia Nacional de Medicina.

En el presente estudio comparamos los resultados de citogenética convencional (CC), FISH-i, FISH en metafase (FISH-m) y RT-PCR para la detección de la t(9;22) y del reordenamiento BCR/ABL en 23 pacientes con LMC. FISH se realizó con una sonda comercial (VYSIS LSI BCR/ABL ES), que adicionalmente

marca el gen argininosuccinato sintetasa (ASS) obteniéndose una señal extra en el cromosoma 9. En la mayoría de los pacientes (18/23=78%) FISH-i mostró un patrón típico (PT) de señales. Estudios de CC y RT-PCR confirmaron la presencia de la t(9;22) y de los reordenamientos característicos en todos los casos excepto en uno donde el cariotipo mostró como única anomalía una t(1;11). FISH-m demostró la presencia del cromosoma Ph enmascarado sobre el derivado críptico 22. En 5/23 (22%) se detectaron patrones atípicos (PA) de señales. En 3/5 se originaron por cambios numéricos adicionales, duplicación Ph (1/3) y ganancia de un cromosoma 9 (2/3) En uno de éstos casos se identificó un iso(9q) por CC y FISH-m. En los 2/5 casos restantes observamos PA complejos. En un caso, FISH reveló la delección del gen ASS y la inserción críptica de secuencias del gen ABL en 22q11.2 a pesar de que el cariotipo fue normal. En el último caso observamos la presencia de 4-8 señales de fusión en interfase, indicando la amplificación del gen BCR/ABL. FISH-m localizó éstas señales sobre un add(22)(q22.1) identificado por CC. En los 5 pacientes con PA, se detectó el gen de fusión b3a2 por RT-PCR. En conclusión, FISH-i reveló alteraciones genéticas subyacentes originando PA en el 22% de los casos y en un paciente mostró un PT originado por el cromosoma Ph no identificado por CC. La definición precisa de las alteraciones genéticas presentes depende de la correcta integración de los datos de CC, FISH y RT-PCR.

150. (3856) GENOTIPIFICACIÓN DE MARCADORES POLIMÓRFICOS DEL GEN DE LA TIROGLOBULINA. EVIDENCIAS DE QUE LA MUTACIÓN R277X SE DEBE A UN EFECTO FUNDADOR. DOMENÉ, SABINA; RIVOLTA, CARINA M; MOYA, CHRISTIAN M; VARELA, VIVIANA; TARGOVNIK, HÉCTOR M

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

El gen de la tiroglobulina (TG) humana está ubicado en el brazo largo del cromosoma 8 y posee 270Kb de longitud. El hipotiroidismo congénito con bocio por mutaciones en el gen de la TG ha sido descrito en humanos y en modelos animales. La prevalencia del hipotiroidismo neonatal en nuestro país es de 1/3000, lo que revela su importancia dentro de la patología humana y por lo tanto la aplicación de nuevas herramientas permitirá un diagnóstico más preciso de esta enfermedad. Los objetivos del presente trabajo incluyen la genotipificación de cuatro marcadores polimórficos ubicados en el gen de la TG en 100 individuos no relacionados de la población general, la determinación de los haplotipos y el estudio de la asociación de los marcadores polimórficos con la mutación R277X identificada en dos familias con bocio congénito e hipotiroidismo. Los marcadores polimórficos estudiados fueron: un polimorfismo de inserción/delección de 1464 pb (Indel) en el intrón 18, dos microsatélites en el intrón 29 y 30 (STR 29 y STR 30) y un SNP (7589G>A) en el exón 44. En los 100 individuos de la población se observaron las siguientes frecuencias alélicas: para el Indel, f(I)=0.58 y f(D)=0.42, para el STR 29, f(1)=0.28, f(2)=0.23, f(3)=0.48 y f(4)=0.01, para el STR 30, f(1)=0.10, f(2)=0.113, f(3)=0.0052, f(4)=0.01, f(5)=0, f(6)=0.052, f(7)=0.71 y f(8)=0.0052, para el SNP 7589G>A, f(Glu)=0.49 y f(Arg)=0.51. El análisis de los miembros de ambas familias que contienen la mutación R277X indica que la mutación está siempre asociada a la inserción en el sistema Indel, al alelo 3 en el STR 29 y a la presencia de G en la posición 7589 en el SNP. En conclusión, determinamos los genotipos y haplotipos de los 4 marcadores polimórficos del gen de la TG en la población y establecimos que los individuos portadores de R277X presentaron un idéntico haplotipo indicativo de un ancestro común, luego la mutación R277X es debida posiblemente a un efecto fundador.

151. (3861) DETECCIÓN DE TODAS LAS MUTACIONES ACTIVANTES REPORTADAS DEL ONCOGEN NRAS HUMANO MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE GENERADORES DE HETERODUPLEX (GH). BELLI, CAROLINA; DE BRASI, CARLOS; LARRIPA, IRENE

Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina

Las mutaciones puntuales del gen NRAS que afectan los codones 12, 13 y 61 han sido reportadas en varios tumores y enfermedades hematológicas. Aunque existen numerosos métodos para el análisis de dichas mutaciones, ellos presentan desventajas asociadas a la especificidad y/o sensibilidad. El método de GH se basa en el comportamiento electroforético diferencial de heterodúplex inducidos entre la muestra incógnita y un generador sintético, el cual posee un identificador de las mutaciones a analizar. Objetivo: Diseñar un nuevo GH capaz de detectar las mutaciones del codón 61 y que funcione en multiplex, junto al ya descrito para los codones 12 y 13 (Belli et al. Hum Mut 2003), a fin de detectar todas las mutaciones activantes del gen NRAS. El GH-61, cuyo indicador es una inserción de 5T, discriminó las 7 mutaciones (panel de plásmidos mutantes) de la secuencia normal y fue capaz de trabajar en conjunto al GH-12-13 en PCR multiplex. Así, en un solo ensayo pueden ser discriminados los 19 patrones alterados de los 2 patrones normales. El método fue probado en 6 pacientes, en líneas celulares hematológicas (HL60, AL-HL3, Molt-4, P39, RS4-11) y en 19 plásmidos con diferentes mutaciones previamente caracterizadas y/o reportadas. Mediante la utilización de controles normales (15 dadores sanos y la línea celular K562) se descartó la presencia de falsos (+). Esta metodología resultó altamente específica, sensible, reduce tiempos y costos, dado que sólo requiere una amplificación por PCR y una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Este método, capaz de identificar las 19 mutaciones de los codones 12, 13 y 61 del gen NRAS, representa una alternativa para la detección de dichas alteraciones fácilmente aplicable tanto para el análisis de series clínicas como para la rutina diagnóstica.

152. (3965) MUTACIONES EN EL GEN DE LA CONEXINA 26 COMO CAUSA DE SORDERA NO SINDRÓMICA: PREVALENCIA DE 35DELG Y 167DELT EN ARGENTINA. GRAVINA, LUIS PABLO; GARRIDO, JENNIFER; PRIETO, MARIA EUGENIA; MARTIN, HUGO; BARREIRO, CRISTINA; CHERTKOFF, LILIE

Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Aproximadamente 1/1000 niños nace con una pérdida auditiva severa. De ellos, 50-60% se debe a factores genéticos, la mayoría de los cuales son no sindrómicos y de herencia autosómica recesiva. Al menos la mitad de las sorderas no sindrómicas recesivas está causada por mutaciones en el gen de la Conexina 26 (GJB2). En particular, la mutación 35delG, es altamente prevalente en poblaciones caucásicas de Europa y Norteamérica. Una segunda mutación, 167delT, tiene una alta frecuencia en judíos Ashkenazi. Hasta el presente, no se conoce la relevancia de estas mutaciones en población argentina. Con el objetivo de establecer la prevalencia de las mutaciones 35delG y 167delT en la población afectada de Argentina, se estudiaron 22 pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica severa a profunda (4 casos familiares y 18 aparentemente esporádicos). La mutación 35delG se analizó mediante PCR e hibridización alelo específica y 167delT por PCR y digestión con PstI. Las muestras positivas fueron confirmadas por secuenciación. En 8 sujetos (36.4%) se detectó al menos una mutación. Se identificaron 3 homocigotas 35delG, un compuesto heterocigota 35delG/167delT y los 4 restantes tuvieron sólo un alelo identificado (tres 35delG y un 167delT). Este estudio confirma la alta prevalencia de 35delG (frecuencia alélica 0.23) y la presencia de 167delT (0.045) en este grupo de pacientes. La frecuencia de mutaciones encontrada en casos aparentemente esporádicos (39%) es similar a la reportada en la literatura si bien el nivel de detección en casos familiares (25%) resultó sensiblemente inferior. Un análisis más exhaustivo del gen GJB2 y el estudio de otros genes involucrados (ej. GJB6) permitirán definir más claramente el patrón genético de las sorderas no sindrómicas en nuestra población.

153. (3980) INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL SEXO EN LA RELACION ENTRE EL ALELO E4 DE LA APOLIPOPROTEINA E Y LA ATROSCLEROSIS. BAÑARES, V; PETERSON, G; AGUILAR, D; SISÚ, E; GULAYIN, R; PIVETTA, O; TAVELLA, J

CENAGEM, A.N.L.I.S.; PROPIA-CIC, UAP; Inst. del Tórax, La Plata; CONICET, Argentina

La apolipoproteína E tiene un rol importante en el transporte de lípidos y en el control homeostático de la concentración de colesterol. En nuestra población (como en algunas otras) la presencia del alelo e4, en varones de hasta 60 años, con lesión aterosclerótica es mayor que en la población general. Otros autores observaron esta asociación solo en los varones jóvenes de sus poblaciones. Objetivo: analizar la influencia de la edad y el sexo sobre la presencia del alelo e4 en pacientes con aterosclerosis en nuestra población. Obtuvimos los genotipos, con PCR y digestión con enzima de restricción, en 189 muestras de ADN de pacientes con lesión aterosclerótica objetivada por angiografía, 46 mujeres y 143 varones, con edad entre 30 y 80 años. En el análisis estadístico agrupamos los genotipos según la presencia o la ausencia del alelo e4. Observamos una tendencia descendente en las edades medias de los pacientes con genotipos e2/e3, e3/e3 y e3/e4 ($p < 0.03$). La presencia del alelo e4 en los varones de 30 a 45 años es mayor que en los de 45 a 60 años, $p < 0.04$ y que en los de 60 a 80 años, $p < 0.004$. Entre las mujeres no hay diferencias significativas. Concluimos que la asociación entre el alelo e4 y la lesión vascular aterosclerótica es dependiente de la edad y el sexo en nuestra población.

154. (3982) CAMBIOS A NIVEL DEL HETERODUPLEX EN EL EXÓN 7 DEL GEN DE LA PBG-DEAMINASA. MOLINA CAMPOS, ELIZABETH; RÍOS DE MOLINA, MARÍA C.

Dpto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) es una enfermedad asociada a un defecto en el gen de la porfobilinógeno deaminasa (PBG-D), tercera enzima del camino metabólico del hemo. Este defecto genético, de carácter autosómico dominante, provoca una pérdida del 50% en la actividad PBG-D. Por otra parte, existen pacientes sintomáticos con actividad PBG-D normal así como también una superposición entre el valor máximo eritrocitario de los portadores y el inferior de sujetos control. Es muy importante, por lo tanto, el diagnóstico genético que permite detectar a los portadores no manifiestos. En este trabajo se presentan los estudios genéticos de 4 personas, 2 de las cuales son miembros de una misma familia. De los dos individuos emparentados, uno tiene actividad PBG-D disminuida y el otro normal. Por otro lado, el tercer y cuarto propósito (no emparentados) presentaron valores normales y disminuidos de la PBG-D respectivamente. Se purificó ADN de sangre periférica y se amplificaron, por PCR, los 15 exones del gen de la PBG-D, diseñando y empleando pares de primers que incluyen las regiones intrónicas adyacentes. Se aplicó la técnica de SSCP (polimorfismo conformacional de cadena simple) a los productos de PCR. Los datos obtenidos mostraron un patrón electroforético alterado para el exón 7 a nivel del heterodúplex, en los 4 sujetos arriba mencionados. La electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR también reveló esta diferencia. Dado que esta alteración se detectó tanto en individuos porfíricos como en no-porfíricos, se concluye que hemos detectado un nuevo polimorfismo, esta vez en el exón 7, que debe ser bastante importante dado que provoca un gran cambio en los perfiles electroforéticos. El hecho de que dos de los portadores tengan actividad PBG-D normal implicaría que el cambio no afectaría el sitio activo de la enzima.

155. (4033) ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE DISTRIBUCIÓN DE ALELOS DEL DQB1 (HLA) Y DEL VNTR DE LA INSULINA Y LA PREDISPOSICIÓN A DIABETES AUTOINMUNE. CERRONE GE¹, CAPUTOM¹, LÓPEZ AP^{1,2},

MASSA C³, CÉDOLA N⁴, TARGOVNIK HM¹, FRECHTEL GD^{1,2}

¹Laboratorio de Biología Molecular. Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica.

²División Genética, Hospital de Clínicas "José de San Martín" Universidad de Buenos Aires. ³Servicio de Nutrición, Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan". ⁴Centro Endocrinología Experimental y Aplicada, Universidad Nacional de La Plata, CONICET.

Introducción: la diabetes autoinmune tiene dos formas de presentación clínica: la diabetes tipo 1 (DM1) se presenta en la edad infantojuvenil y la diabetes autoinmune del adulto (LADA) se manifiesta en adultos por encima de los 35 años. Son patologías de tipo poligénico con alelos polimórficos en los genes de clase II del Sistema HLA que constituyen el locus mayor de predisposición. El minisatélite (VNTR) en el extremo 5' del gen de la insulina es el segundo locus en importancia. Objetivos: evaluación de la distribución de alelos del HLA DQB1 y del VNTR (y subclases S, M y L de alelos de clase I) en población normal, pacientes con DM1 y LADA. Métodos: se estudiaron 93 pacientes con DM1 y 43 pacientes con LADA con anticuerpos contra la célula β del páncreas, y 138 individuos controles no diabéticos. Se determinaron los alelos del DQB1 por Dot Blot reverso (Inno LIPA), el VNTR se analizó por Southern Blot e hibridación con la sonda de ADN copia p-chil 19 y las subclases de alelos de clase I se determinaron por PCR y posterior electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%. Resultados: el genotipo homocigota 0201/0201 del gen DQB1, presentó una diferencia estadísticamente significativa entre DM1 y LADA al compararlos con el grupo control ($p: 0.0269$ y $p: 0.0123$, respectivamente). Hallamos una significativa asociación entre los alelos de clase I en DM1 (81,3%) y LADA (80,6%) comparado con los controles (70%) ($p < 0.05$). La mayor presencia de alelos de clase I fue debida a la alta frecuencia del genotipo S/S ($p < 0.05$). Conclusión: se analizaron las diferencias en el perfil genético de los individuos con DM1 y los LADA. Se determinó la asociación de alelos del DQB1 del HLA y del alelo de clase I del VNTR (y sus subclases) a la predisposición a la diabetes autoinmune.

156. (4052) GENERACIÓN DE UN DISPOSITIVO DERMO-EPIDÉRMICO UTILIZANDO QUERATINOCITOS GENÉTICAMENTE MODIFICADO. GENOVESE, J; PRIEGUE, C; MUDROVICI, V; CORREA, L; PODHAJECER, O

Laboratorio Craveri S.A.I.C

El dispositivo dermo-epidérmico es un sustituto celular equivalente a la piel, utilizado en el tratamiento de úlceras y quemaduras. Al ser el sistema vascular dérmico un medio ideal para la secreción de proteínas terapéuticas producidas por células modificadas genéticamente, generamos un dispositivo dermo-epidérmico con queratinocitos genéticamente modificados. Para esto se aislaron fibroblastos y queratinocitos de biopsias de piel y se expandieron in vitro. Se transdujeron los queratinocitos con vectores retrovirales llevando el gen para EGFP o IL-12 murina. Como matriz biodegradable se utilizó colágeno I, aislado y purificado, de tendón de Aquiles bovino. La dermis artificial se construyó gelificando colágeno I por neutralización y agregando simultáneamente los fibroblastos. A las 48 hs se sembraron sobre esta neo-dermis los queratinocitos genéticamente modificados. Se evaluó la expresión de EGFP mediante microscopía confocal. La producción de IL-12 se midió utilizando la técnica de ELISA. Los dispositivos modificados genéticamente fueron implantados en animales. Se obtuvieron queratinocitos modificados genéticamente expresando EGFP o IL-12 murina. Los dispositivos dermo-epidérmicos modificados genéticamente demostraron expresar, y en el caso del IL-12, secretar las proteínas agregadas. Este dispositivo modificado conserva las mismas propiedades físicas y curativas del dispositivo no modificado. Se generó un dispositivo dermo-epidérmico modificado genéticamente que produce y secreta proteínas. Los presentes datos son una evidencia de la potencial aplicación de los sustitutos biológicos de

la piel, generados por ingeniería de tejidos, para realizar terapia génica ex vivo tanto de enfermedades cutáneas como sistémicas.

HEMATOLOGÍA II

157. (3523) COMPORTAMIENTO DEL FIBRINÓGENO PLASMÁTICO EN ARTROPATÍA EXPERIMENTAL TRATADA CON LÁSER Y CELECOXIB. CAMPANA, VILMA; MOYA, MONICA; GAVOTTO, ANTONIO; SIMES, JUAN; SPITALE, LUIS; PALMA, JOSE

Cátedra de Física Biomédica. Fac. Cs. Ms. UNC

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el comportamiento del fibrinógeno plasmático como marcador de un proceso inflamatorio inducido por cristales de hidroxiapatita en articulaciones de ratas y posteriormente tratadas con láseres de baja potencia y/o celecoxib. Se inyectaron 2 mg de hidroxiapatita en cada articulación de los miembros posteriores, en 2 veces con un intervalo de 24 hs. entre la 1ª y la 2ª inyección. Se utilizaron láseres de He-Ne y de Arseniuro de Galio. Las aplicaciones se realizaron diariamente sobre las articulaciones inmediatamente después de la inyección de hidroxiapatita, a las 24 y a las 48 hs. al igual que los 0.05mg/día/rata de celecoxib. La determinación de fibrinógeno se realizó por espectrofotometría. Entre los niveles de fibrinógeno del grupo con artritis inducida (369.00 ± 17.30 mg/100ml) y los grupos con artritis y tratados con celecoxib y/o láseres existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), determinándose valores similares al grupo control (221.64 ± 9.58 mg/100ml). Los resultados demuestran que ambas terapias, láseres y celecoxib individualmente o combinadas actuarían inhibiendo los niveles plasmáticos de fibrinógeno en los animales con artropatías inducidas con cristales de hidroxiapatita.

158. (3612) EFECTOS DE LA HOMOCISTEÍNA SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULA ENDOTELIAL Y EN MACRÓFAGOS. CASTAÑÓN, MARIA MERCEDES; RODRIGUEZ, JANET; LAURICELLA, ANA MARÍA; QUINTANA, IRENE; DELGADO, RENÉ; SASSETTI, BEATRIZ

Depto. Qca. Biológica-Facultad de Cs. Exactas y Naturales-UBA Centro de Química Farmacéutica-CNIC-Cuba

Los niveles elevados de homocisteína (Hcy) plasmática constituyen un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular oclusiva arterial y venosa. Los mecanismos fisiopatológicos involucrados aún no están esclarecidos. Objetivo: evaluar la disponibilidad de óxido nítrico (NO) en células endoteliales de origen humano (HMEC) y en macrófagos murinos (RAW 264) en presencia de Hcy. Se cultivaron las líneas celulares con concentraciones crecientes de Hcy (100 a 500 mM). Se midieron los niveles de nitritos (NO_2^-) por el método de Griess. Se determinó la expresión de eNOS (NO sintetasa constitutiva) en HMEC por western blot. La expresión de iNOS (NO sintetasa inducible) se evaluó en RAW 264 pre y post estimulación con lipopolisacárido (LPS) y gamma-interferón (γ INF). Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y los resultados se expresan como media y desvío estándar. Los niveles de NO_2^- en los sobrenadantes de cultivo de HMEC disminuyeron $16 \pm 3\%$ (para 100 μM Hcy) y $41 \pm 5\%$ (para Hcy 500 μM) respecto del control. No se observó efecto citotóxico asociado a la Hcy en las concentraciones utilizadas (método con MTT). Se observó $30 \pm 5\%$ de disminución de la proliferación celular aún con Hcy 100mM. Post estimulación con LPS/ γ INF, la producción de NO_2^- en RAW 264 con Hcy 500 μM fue $18 \pm 3\%$ y con el inhibidor de NO (L-NMMA 2 mM) fue $5,3 \pm 1,0\%$ del control. En conclusión, la Hcy afectaría el sistema celular inhibiendo su proliferación y disminuyendo la biodisponibilidad de NO en HMEC y RAW 264, manteniendo sin embargo, la expresión de NOS. Por lo tanto la hiperhomocisteinemia (HHcy) generaría bajos niveles de NO disminuyendo así su acción natural vasodilatadora y antiagregante de plaquetas. Estos hallazgos soportarían el rol trombogénico de la HHcy.

159. (3620) DERMATÁN SULFATO COMO MODULADOR DE LA ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO POR ESTREPTOQUINASA. CASTAÑÓN, MARIA MERCEDES; GAMBA, CECILIA; KORDICH, LUCIA

Depto. Qca. Biológica - Facultad de Cs. Exactas y Naturales - UBA

Recientemente algunos autores han sugerido que el Dermatán Sulfato (DS) tendría actividad profibrinolítica, además de su conocida acción potenciadora del Cofactor II de la Heparina para inhibir trombina. Objetivo: estudiar in vitro el efecto del DS de bajo (DSB) y alto peso molecular (DSA) sobre la activación de plasminógeno (Plg) por estreptoquinasa (SK). Se evaluó la acción de DSB y DSA en las siguientes concentraciones: 4, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 $\mu\text{g/ml}$; utilizando un método amidolítico cinético en el que se monitorea la actividad amidolítica del complejo Plg (0,3 μM) / SK (10 U/ml) con un sustrato cromogénico específico (S-2251; 0,5 mM). Se indica concentraciones finales en el medio de reacción. Los datos de absorbancia vs. tiempo se ajustaron a una curva sigmoidea, se obtuvieron los parámetros: tiempo asociado al 50 % de reacción ($t_{1/2}$) y estimador de la velocidad de reacción (V) y se definieron dos factores: f ($t_{1/2}$) (cociente entre $t_{1/2}$ [DS] y $t_{1/2}$ [control]) y f [V] (cociente entre V [DS] y el V [control]). Se define potenciación = f ($t_{1/2}$) < 1 , f [V] > 1 e inhibición = f ($t_{1/2}$) > 1 , f [V] < 1 . Tabla: f promedio \pm error estándar ($n=4$). Los efectos observados fueron corroborados a distintas concentraciones de SK (5 - 50 U/ml).

DS ($\mu\text{g/ml}$)	4	16	32	64	128	256	512
DSB f ($t_{1/2}$)	$0,97 \pm 0,03$	$0,95 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,04$	$0,89 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,04$	$0,89 \pm 0,04$
DSB f [V]	$0,95 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,05$	$1,19 \pm 0,05$	$1,24 \pm 0,04$	$1,38 \pm 0,06$	$1,37 \pm 0,04$	$1,38 \pm 0,05$
DSA f ($t_{1/2}$)	$1,07 \pm 0,03$	$1,18 \pm 0,03$	$1,31 \pm 0,04$	$1,57 \pm 0,04$	$1,85 \pm 0,05$	$2,32 \pm 0,06$	$2,84 \pm 0,06$
DSA f [V]	$1,03 \pm 0,07$	$1,13 \pm 0,08$	$1,1 \pm 0,08$	$1,03 \pm 0,08$	$0,9 \pm 0,08$	$0,71 \pm 0,06$	$0,57 \pm 0,04$

El DS de bajo PM produjo un aumento de la activación de Plg por SK en función de la concentración, apoyando la hipótesis de su actividad profibrinolítica (aumentó 38% la velocidad de activación y disminuyó 10% el tiempo asociado al 50% de la reacción). El DS de alto PM presentó efecto inhibitorio.

160. (3669) AGREGACIÓN ERITROCITARIA EN PACIENTES CON RAYNAUD. SPENGLER, MARÍA ISABEL; SVETAZ, MARÍA; LEROUX, BIBIANA; LEIVA, MERCEDES; BOTTAI, HEBE

Cát. Biofísica, Cát. Dermatología. Facultad de Ciencias Médicas, Sec. Inmunidad Cel. Cát. Estadística, F.B y F., UNR

Sobre la base de una posible participación de disturbios reológicos en el mecanismo fisiopatológico del Raynaud, nos interesamos en evaluar, en pacientes con Raynaud, algunas propiedades reológicas de la sangre, medidas bioquímicas como concentración plasmática de fibrinógeno y de inmunoglobulinas, la capilaroscopia periungueal, correlacionando los resultados. Las variables explicativas fueron viscosidad sanguínea y plasmática, medidas con viscosímetro cono-plato; velocidad de agregación eritrocitaria (V), por un método que mide luz transmitida a través de una muestra sanguínea; fibrinógeno plasmático (F), por método gravimétrico; e inmunoglobulinas G y M, por inmunodifusión radial. La variable respuesta fue el patrón de capilaroscopia periungueal (con lupa estereoscópica de hasta 40 aumentos), categorizado como patrón normal (PN) o patrón patológico (PP). Las variables F, V e IgM fueron significativamente mayores ($p < 0,05$ para F, V e IgM) en pacientes con PP en comparación con pacientes con PN. El análisis estadístico de los datos (modelo de regresión logística dicotómica), nos permitió la modelización de la probabilidad de presencia de PP en función de la concentración de F. El odds ratio resultó igual a 2,18, indicando que por cada aumento de 100mg/dl de F, incrementa 2,18 veces la probabilidad de presentar PP. En base a estos resultados proponemos la hipótesis que para estos pacientes, la elevación de la concentración plasmática de F e IgM resulta en un incremento en la V, la

que determina un enlentecimiento del flujo formando áreas localizadas de estasis y provocando hipoxia y acidosis. Esto, a su vez, determina un aumento de la V, cerrándose así un círculo vicioso que se autoalimenta, y explicando la relación entre el aumento de la concentración de F y la presencia de PP en estos pacientes.

161. (3670) EFECTO DE LA TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO (THR) SOBRE LA AGREGACIÓN ERITROCITARIA EN MUJERES MENOPÁUSICAS. SPENGLER, MARÍA ISABEL; BRAVO LUNA, MARTA; RASIA, MARTA

Fac. de Cs. Médicas CIUNR

El riesgo de enfermedad cardiovascular en la mujer menopáusica ha sido relacionado a los cambios hormonales característicos y se ha comprobado su disminución por THR. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la THR en 32 mujeres menopáusicas, analizando las variaciones en la viscosidad plasmática(n), fibrinógeno plasmático(f) y velocidad de agregación eritrocitaria(V) antes de la administración de la droga y a los 6 y 12 meses de tratamiento. Se determinaron: n con un viscosímetro cono-plato, f por método gravimétrico y V por un método que mide luz transmitida a través de una muestra sanguínea. En el análisis estadístico de los datos se aplicó Anova y test de Newman-Keuls. De acuerdo a los resultados obtenidos, f disminuyó significativamente a los 6 meses de tratamiento y dichos valores se mantuvieron los 6 meses siguientes ($F=26,37$; $p<0,05$). Una variación con igual comportamiento presentaron la V ($F=22,32$; $p<0,005$) y la n ($F= 11,32$, $p<0,005$). Cuando se estudió la correlación de los valores de f con los de n y V a través de una regresión múltiple, se observó que existe una correlación estadísticamente significativa ($r=0.43$) tanto en condiciones basales como a los 6 y 12 meses de tratamiento. En base a estos datos podemos concluir que la disminución en el fibrinógeno plasmático por THR sería la causa de la disminución de la velocidad de agregación y de la viscosidad plasmática lo que beneficiando al flujo sanguíneo constituye un mecanismo adicional por el cual la THR disminuiría el riesgo de enfermedad cardiovascular en mujeres menopáusicas.

162. (3716) IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE POLIMORFONUCLEARES HUMANOS QUE UNEN GALECTINA-1 ESPLÉNICA PORCINA. CHIESA, MARÍA ELENA; PISTACCIO, LUIS; FINK, NILDA

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP Servicio de Hematología, Hospital Interzonal de Agudos Especializado Sor María Ludovica

En estudios previos se detectó la presencia de ligandos endógenos para galectina -1 esplénica porcina (SPG1) en neutrófilos humanos (PMN). Con el objeto de identificar las proteínas de membrana en PMN, como potenciales ligandos/ receptores para SPG1, se incubó 50µl de una suspensión de PMN (2×10^6 células /ml) obtenidos de sangre periférica(SP) purificados con Ficoll-Hypaque-dextran, con igual volumen de galectina (1µM), durante 30 minutos a ta. Luego de lavados, se incubaron con anticuerpos marcados disponibles, antiCD45, CD45RA, CD45RO, CD11a, b y c, CD33 y CD65. Se hicieron pruebas de inhibición de la galectina con lactosa 100mM incubando previamente la SGP1 por 30 minutos a ta y luego se prosigue según lo descrito antes. Los histogramas obtenidos (N=5) en un citómetro Coulter EPICS-XL muestran un descenso de la intensidad de fluorescencia para todos los antiCD, excepto CD45RO y RA, del orden de 28 al 87 % respecto a controles sin SGP1; dicho descenso fue estadísticamente significativo solo para anti-CD33 ($p < 0,05$). La lactosa inhibe parcialmente esas interacciones; así la unión SPG1-CD33 es inhibida específicamente en un 47%. Se concluye que según nuestros datos la unión SPG1/ PMN estaría mediada, al menos en parte, por esas moléculas. Las mismas podrían ser solo ligandos o activar iguales o diferentes señales en el PMN de SP, influenciado así su actividad en el proceso inflamatorio.

163. (3752) DEFORMABILIDAD Y RESISTENCIA OSMÓTICA ERITROCITARIA EN RATAS TRATADAS CON ALUMINIO (AL) Y HEPATECTOMIZADAS. POSIBLE RELACIÓN CON COLESTEROL PLASMÁTICO (CO). CONTINI, MARÍA DEL CARMEN ADA; BAZZONI, GRACIELA BEATRIZ; CHIAROTTO, MARCELO; CARNOVALE, CRISTINA ESTER

Cát. Fisiología. Fac Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL Cát. Biofísica Fac. Cs. Médicas. Cát. Fisiología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. CONICET

Se ha descrito en ratas hepatectomizadas una disminución de Co y en ratas tratadas con Al una disminución en la deformabilidad eritrocitaria. Otros autores han demostrado que la disminución de Co produce una rigidación de la membrana del eritrocito. Objetivo: Estudiar la deformabilidad y la resistencia osmótica eritrocitaria en ratas tratadas con Al y hepatectomizadas y su posible relación con el Co. Métodos: Ratas Wistar machos adultas fueron divididas en cuatro grupos (n=4 c/u): Sham (SH) con cirugía simulada, hepatectomizadas (HP) remoción del 65 % del hígado; SH y HP tratadas con Al (OH)[3] 80 mg/kg PC i.p. 3 veces/semana 3 meses (SHAl y HPAl). 48 horas post-cirugía, se extrajo sangre anticoagulada, determinándose: Co (método enzimático), índice de rigidez(IR) (estimación de deformabilidad eritrocitaria, por filtración por membrana nucleopore) y resistencia osmótica en soluciones de NaCl a distintas osmolaridades, calculando X[50]: concentración de NaCl que produce el 50% de hemólisis. Resultados: (x media ± ES). Co (g/l): SH: $1,36 \pm 0,06$; HP: $0,77 \pm 0,02^*$; SHAl: $0,72 \pm 0,04^*$; HPAl: $0,96 \pm 0,09^*$. IR(%): SH: $9,23 \pm 0,40$; HP: $17,2 \pm 0,44^*$; SHAl: $>20^{**}$; HPAl: $>20^{**A}$. X[[50]] (mM): SH: $81,56 \pm 0,40$; HP: $75,07 \pm 0,62^*$; SHAl: $69,95 \pm 0,24^*$; HPAl: $75,13 \pm 0,35^*$. (* $p<0,05$; ** $p<0,0001$, vs. SH; ^ $p<0,05$ vs. HP; ANOVA-test de Tuckey). Conclusión: En ratas HPAl se produjo un aumento de la rigidez eritrocitaria (aumento del IR y de resistencia osmótica) asociada con la disminución del Co ($r=-0,6475$, $p<0,05$, $n=19$) que modificaría el contenido de colesterol de membrana, disminuyendo la deformabilidad del eritrocito. Por lo que se puede considerar al Co junto al efecto que produce la interacción del Al con la membrana eritrocitaria como factores que contribuirían al deterioro de la misma.

164. (3794) EFECTO DEL NIVEL DE LOS FACTORES DE COAGULACIÓN FII Y FX EN LA RESPUESTA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA (PCA). GENNARI, LAURA C; BLANCO, ALICIA; DOMINGUEZ, MARÍA PAZ; GROSSO, SILVIA; LAZZARI, MARÍA A

Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R Castex", Academia Nacional de Medicina

El aumento de factores y la respuesta anormal a la PCA son factores de riesgo trombótico independiente. La asociación entre el aumento de fVIII o fll y la respuesta anómala a la PCA, sería el mecanismo que explicase su rol pro-trombótico. Evaluamos, in vivo e in vitro, el efecto del aumento de fll o fX sobre la respuesta a la PCA y su asociación con el fenotipo resistente. El efecto in vivo se analizó en plasmas de pacientes con eventos trombóticos venosos y niveles plasmáticos entre 100 y 125 U/dl, sin FV Leiden ni FII 20210A, determinándose la resistencia a la PCA por la técnica original (RPCA) en cada uno de ellos. A fin de evaluar el efecto in vitro, a un pool de plasmas normales se adicionó cantidades crecientes de fll o fX humanos purificados (concentración final: 100, 140, 180 y 220 U/dl). En cada una de las alícuotas se determinó la RPCA (cuadruplicado) y la actividad coagulante del factor adicionado para verificar la funcionalidad del mismo. En el análisis estadístico se aplicaron pruebas no paramétricas. La RPCA no mostró correlación ($r_{fll} = 0,423$; $p = 0,117$; $r_{fX} = -0,169$; $p = 0,548$) con los niveles plasmáticos de fll o fX, pero sí con el aumento de factores exógenos ($r_{fll} = -0,780$; $p < 0,001$; $r_{fX} = -0,968$; $p < 0,001$) sin alcanzar valores patológicos. El agregado de fll indujo disminución significativa ($p = 0,018$) de la respuesta a la PCA entre 100 y 140 U/dl. La disminución de la respuesta a la PCA fue significativa a medida que aumentaron los niveles de fX (100 vs 140 $p = 0,018$; 140 vs 180 $p = 0,020$; 180

vs 220 p= 0,028). Sólo altas concentraciones de fll o fX, mayores o iguales a 140 U/dl, afectarían la respuesta a la PCA sin alcanzar, en los ensayos realizados, valores patológicos. No sería posible asociar, al menos con nuestra metodología, el riesgo trombótico por aumento plasmático de fll o fX, a un defecto en el sistema de la PC.

INMUNOLOGÍA IV

165. (3298) EVALUACION DE PROTEINAS DE PROTEOBACTERIAS RHIZOBIALES NO PATÓGENAS COMO ANTIGENOS ALTERNATIVOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS. DELPINO, M. VICTORIA; FOSSATI, C. ALBERTO; BALDI, PABLO C.

IDEHU, Fac. Farmacia y Bioquímica

La brucelosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Brucella*, perteneciente a la clase alfa Proteobacteria. La producción de antígenos para el diagnóstico implica la manipulación de *Brucella* viva. Evaluamos por ELISA si las proteínas citoplasmáticas de otras alfa proteobacterias (*Agrobacterium* sp, *Sinorhizobium* sp and *Ochrobactrum* sp) exhiben reactividad cruzada con *Brucella* y pueden ser útiles para el diagnóstico de brucelosis. Los valores de corte fueron calculados como la media \pm 2 SD de las densidades ópticas específicas (DOs= DO con antígeno - DO sin antígeno) obtenidas con sueros normales (humanos, 20; ovinos, 20; bovinos, 36; caninos, 34). Se ensayaron sueros de humanos (n=32), ovinos (n=75), bovinos (n=59) y caninos (n=61) infectados. Todos los sueros habían sido positivos contra proteínas citoplasmáticas de *Brucella* sp por ELISA. La infección por *B. canis* fue detectada con alta especificidad (97.6% para *Agrobacterium*, 93.3% para *Sinorhizobium*, 100% para *Ochrobactrum*) y sensibilidad variable (32% para *Agrobacterium*, 77% para *Sinorhizobium*, 100% para *Ochrobactrum*) con todos los ELISAs, y fue posible diagnosticarla tempranamente (15 días p.i.). En contraste, los sueros normales humanos, ovinos, y bovinos arrojaron altas DOs, y por ende altos valores de corte, generando baja sensibilidad diagnóstica. Para los sueros humanos, los valores de corte fueron 2.550 para *Agrobacterium*, 1.820 para *Sinorhizobium*, 1.500 para *Ochrobactrum*; para ovinos, los valores de corte fueron 1.821, 1.255, 0.856, respectivamente; para bovinos los valores de corte fueron 0.822, 0.930, 0.665, respectivamente. Estos resultados muestran que los anticuerpos anti proteínas citoplasmáticas de proteobacterias relacionadas no tienen valor diagnóstico en la brucelosis de ovinos, bovinos y humanos. Sin embargo, es altamente específica y sensible para el diagnóstico de brucelosis canina y puede detectar la infección por *B. canis* a cortos tiempos después de la exposición al patógeno.

166. (3375) APOPTOSIS HEPATOCELULAR DURANTE LA INFECCIÓN POR CANDIDA ALBICANS Y EXACERBACIÓN POR EFECTO DEL ESTRÉS. RENNA, MARIA SOL; PORPORATTO, CARINA; AOKI, MARIA DEL PILAR; SALIDO RENTERIA, BEATRIZ; CORREA, SILVIA G; SOTOMAYOR, CLAUDIA ELENA

Inmunología- Dpto de Bqca Clínica- Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Córdoba

C. albicans es el mayor patógeno fúngico aislado de humanos, particularmente en individuos inmunocomprometidos, siendo la mucosa gastrointestinal la vía más frecuente para su diseminación hematogena. En este proceso el hígado constituye la primera barrera de control; su habilidad para limitar el crecimiento del hongo y desarrollar una eficiente reacción inflamatoria es crucial en la evolución de la infección. En el laboratorio desarrollamos un modelo in vivo que permite evaluar el rol del hígado en el control temprano de esta micosis en huéspedes normales e inmunocomprometidos. En este modelo la aplicación de un esquema de estrés modifica el estatus inmunológico del huésped

y aumenta la susceptibilidad a la infección. Una marcada hepatotoxicidad estuvo asociada a la presencia del hongo y al estrés. El objetivo, en esta etapa fue evaluar si la apoptosis hepatocelular contribuye a la marcada injuria hepática observada en este modelo. Ratas Wistar se dividieron en 4 grupos: Normal(N), Estrés(E), infectadas con *C. albicans*(Ca) e infectadas-estresadas(CaE) y sacrificadas a los 3 días. La presencia de apoptosis in situ (DAPI) estuvo asociada al proceso infeccioso, observándose aumento en el número de células TUNEL positivas en el grupo CaE. Citoquinas como TNF- α y la interacción Fas/Fas-L están involucradas en el daño hepático y en la inducción de apoptosis. La expresión intrahepática del RNAm para TNF- α evaluada por RT-PCR estuvo aumentada en los animales CaE respecto a los otros grupos. La expresión de la molécula Fas-L evaluada por técnicas de Inmunofluorescencia, en linfocitos intrahepáticos purificados por gradiente de Percoll estuvo marcadamente asociada a la presencia del hongo. Estos resultados evidencian la ocurrencia de apoptosis intrahepática como un mecanismo temprano asociado a la patogenia de esta micosis. Este fenómeno se ve incrementado por la exposición a los mediadores de la respuesta al estrés.

167. (3516) UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE OMP31 DE B: MELITENSIS EN BRUCELOSIS HUMANA Y ANIMAL. PASQUEVICH, KARINA; CASSATARO, JULIANA; BRUNO, LAURA; FOSSATI, ALBERTO; BALDI, PABLO

Cátedra de inmunología (UNLP), Laboratorio de inmunogenética (UBA) IDEHU (UBA)

La proteína de membrana externa de 31kDa (OMP31) está presente en todas las especies de *Brucella* excepto en *B. abortus* y tiene alta homología con OMP25, presente en todas las especies de *Brucella*. La presencia de anticuerpos anti-OMP31 sólo ha sido evaluada en brucelosis ovina (mediante Western blot), hallándose reactividad anti-OMP31 en ovejas infectadas por *B. ovis* pero no en las infectadas por *B. melitensis*. Decidimos estudiar la utilidad de esta proteína en el diagnóstico de brucelosis en animales y pacientes. Obtuvimos OMP31 recombinante purificada de *B. melitensis* y evaluamos por ELISA indirecto la presencia de anticuerpos anti-OMP31 en sueros de humanos y animales con brucelosis. Analizamos sueros de 76 pacientes, 57 ovejas (39 infectadas con *B. melitensis* y 18 con *B. ovis*) y 31 perros. La infección humana había sido confirmada por el hallazgo de altos títulos de IgG anti-LPS en todos los casos y por aislamiento de la bacteria en 29 casos (9 *B. suis*, 5 *B. abortus*, 9 *B. melitensis* y 6 *Brucella* spp.). El 47% de los pacientes estudiados dieron resultado positivo, incluyendo 7 casos de infección por *B. suis*, 2 por *B. abortus*, 3 *B. melitensis* y 2 por *Brucella* spp.. Obtuvimos resultados positivos en el 80% de los perros estudiados. En contraste con otros estudios, se detectaron anticuerpos anti-OMP31 en el 64% de las ovejas infectadas por *B. melitensis* y en el 67% de las infectadas por *B. ovis*. Los resultados obtenidos sugieren que un ELISA indirecto usando únicamente OMP31 recombinante tendría utilidad limitada para el diagnóstico de la brucelosis humana y animal. No obstante, la sensibilidad diagnóstica alcanzada en ovinos fue muy superior a la obtenida por otros investigadores usando Western blot.

168. (3699) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MOLÉCULAS DE SUPERFICIE EN FAGOCITOS MONONUCLEARES (FMN) DE CERDOS INFECTADOS NATURALMENTE CON B.SUIS Y VACUNADOS CON RB51. ¹ARESTEGUI, MIRTA B.; ¹GUALTIERI, CATALINA A.S.; ²GIORDANO, RICARDO; ¹PERALTA, LETICIA; ³SCHAROVSKY, O. GRACIELA

¹Cátedra Sueros y Vacunas, Fac.Cs. Veterinarias, UNR, Casilda ²CIBIC, ³Inst. Genética Exp., Fac. Cs. Médicas, Consejo de Investigaciones, UNR, Rosario

Previamente demostramos que los FMN de cerdos seropositivos (S+) de un establecimiento infectado naturalmente con *B. suis* presentan, post-infección (PO-i) in vitro con *B. suis* cepa 1330 viva, valores mayores de CD11R3 que los de cerdos

seronegativos (S-). Además, pre-infección (PR-i) in vitro expresan más SLA II y CD163 que los (S-). Con el objetivo de estudiar la expresión de los antígenos de superficie mencionados, frente al desafío in vivo con la cepa vacunal en fase rugosa de *B. abortus* y compararla con la obtenida anteriormente, se vacunaron vía s.c. 17 hembras porcinas S+ y 17 S- del establecimiento infectado con 2ml de la vacuna RB51 (Schering Plough). Se obtuvieron FMN pre-vacunación (PR-v) y luego de 6 meses (PO-v) y se analizó la expresión de moléculas superficiales por citometría de flujo. Los FMN de los cerdos S+ PO-v, mostraron disminución de CD163 comparados con los S+ PR-v ($p < 0.001$), sin haber diferencias entre FMN de cerdos S- PR-v y PO-v. El % de células positivas para SLA II y CD11a fue mayor en ambos grupos PO-v que PR-v ($p < 0.001$) y para CD11R3 disminuyó en S+ y S- PO-v con respecto a PR-v ($p < 0.01$). Al comparar los FMN infectados con *B. suis* salvaje con los vacunados con RB51, se observan diferencias en la modulación de SLA II (S+ PO-v > S+ PO-i; $p < 0.0001$) y de CD11a (S- y S+ PO-v > S- y S+ PO-i; $p < 0.0001$). Estos resultados indicarían que la cepa vacunal favorecería la expresión de receptores que participan en la inducción de una vía de lisis ya que, cuando la bacteria entra a la célula a través de CD11a contribuye a la activación de funciones efectoras como la combustión oxidativa y la degranulación. La mayor expresión de SLAII PO-v haría que la presentación antigénica y la respuesta inmune fueran más eficientes que con la cepa de campo.

169. (3723) ANTICUERPOS ESPECIFICOS PARA BACTERIAS ARTRITOGÉNICAS EN LÍQUIDOS SINOVIALES DE PACIENTES CON ARTROPATÍAS. DI GENARO, MARÍA SILVIA; LACOSTE, GABRIELA; TAMASHIRO, HECTOR; STEFANINI DE GUZMAN, ANA

Area Microbiología, Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis Complejo Sanitario San Luis. Caídos en Malvinas 110, (5700) San Luis.

Infecciones por *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Enteritidis*, *Shigella flexneri* y *Klebsiella pneumoniae* están asociadas a Espondiloartropatías (SpA), y por *Proteus mirabilis* a Artritis Reumatoidea (AR). El objetivo del presente trabajo fue analizar la respuesta de anticuerpos específicos para bacterias artritogénicas en líquidos sinoviales (LS) de pacientes con SpA y AR. Se obtuvieron 42 LS: 5 de pacientes con SpA, 17 con AR y 20 con artrosis. Se investigó por ELISA la presencia de anticuerpos específicos para lipopolisacáridos (LPS), sonicados (Soni), y sobrenadantes de cultivo (SN) de *Y. enterocolitica*, *S. Enteritidis* y *S. flexneri*, LPS de *Escherichia coli*; Soni de *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, y colágeno I. El punto de corte fue calculado como la media + 2 SD de las absorbancias de LS de pacientes con artrosis. Muestras reactivas fueron analizadas por inmunoblotting. Se observó respuesta a LPS, SN y Soni de *Yersinia*, *Shigella* y *Klebsiella* en 3 LS de pacientes con SpA. Un LS mostró respuesta específica para Soni de *Klebsiella*. Quince LS de pacientes con AR mostraron respuesta positiva, 5 con reactividad hacia antígenos comunes a diferentes bacterias, y 7 con respuesta positiva a colágeno I. IgA específica para LPS de *Shigella* fue observada en 1 y 3 LS de pacientes con SpA y AR, respectivamente. Por inmunoblotting se observaron bandas de 94, 63 y 56 kDa compartidas por todas las bacterias, y de 30 kDa por *Yersinia* y *Klebsiella*. Se concluye que anticuerpos específicos para bacterias artritogénicas en LS de pacientes con SpA o AR muestran respuesta hacia antígenos bacterianos inmunodominantes compartidos, indicando reactividad cruzada o infección mixta. La respuesta hacia Colágeno I (presente en membrana sinovial) indicaría respuesta autoinmune. Respuesta de IgA contra LPS sugiere estimulación antigénica en mucosas.

170. (3844) EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE VIRAL MEDIANTE PÉPTIDOS SINTÉTICOS QUE IMITAN REGIONES CONSERVADAS DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA. SOUTULLO, ADRIANA; GARCIA, INÉS;

BAILAT, ALEJANDRA; RACCA, ANDREA; TONARELLI, GEORGINA; LUCCA, EDUARDO; MALAN BOREL, ILEANA

Cát de Inmunología Básica-Fac de Bioq y Cs Biológicas-UNL; Minist Agric, Ganadería, Ind y Com Sta Fe Cát Inmunología-Dto Qca Orgánica- FBCB; Cát Infectología-FCV- UNL

La Anemia Infecciosa Equina es una enfermedad crónica, producida por un lentivirus, caracterizada por presentar episodios febriles recurrentes asociados con viremia y anemia. Este virus presenta dos glicoproteínas de envoltura, gp90 y gp45, y cuatro proteínas nucleares de las cuales la p26 está en mayor proporción. En este trabajo se evaluó en sangre proveniente de caballos, en el período asintomático de la enfermedad, infectados espontáneamente con el virus ($n=5$), el nivel de anticuerpos y la capacidad funcional linfocitaria, con especificidad para cada uno de los péptidos sintéticos, gp90, gp45 y p26, que imitan regiones conservadas de las correspondientes proteínas virales. Los niveles de anticuerpos, evaluados por ELISA y expresados como porcentaje de positividad (PP), fueron mayores, respecto a las líneas de corte (28 y 22 para gp90 y gp45 respectivamente), en todos los animales infectados, para gp90: 120, 103, 97, 39, 39 y para gp45: 102, 66, 48, 40, 38. El índice de proliferación (IP), evaluado por incorporación de BrdU, fue mayor al del grupo control (IP=2) en cuatro de los animales para gp90 (29, 3.6, 2.5, 2.5), y en tres para gp45 (30, 6.8, 2.3) y p26 (24, 2.8, 2.3). Estos resultados indicarían que la respuesta inmune humoral y celular desencadenada por el virus, que persiste durante la etapa asintomática de la infección, podría ser evaluada utilizando péptidos sintéticos que imitan regiones conservadas de las distintas proteínas virales.

171. (3888) RECUPERACIÓN TEMPRANA DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A UNA INFECCIÓN RESPIRATORIA POR ADMINISTRACIÓN DE LACTOBACILLUS CASEI EN DESNUTRIDOS. VILLENA, JULIO; RACEDO, SILVIA; AGÜERO, GRACIELA; ALVAREZ, SUSANA

Fac. Bioqca., Qca. y Fcia. Universidad Nacional de Tucumán Centro de Referencia para Lactobacilos

Se demostró que *Lactobacillus casei*, administrado por vía oral, actúa como inmunomodulador en mucosa respiratoria. Este trabajo está dirigido a estudiar si la administración de *L. casei*, en su dosis óptima como inmunomodulador, durante una dieta de renutrición, mejora la respuesta inmune de ratones desnutridos, frente a una infección respiratoria con *Streptococcus pneumoniae*. Distintos grupos de animales desnutridos (D) por déficit proteico fueron renutridos con dieta balanceada (DB) durante 7 días, o dieta balanceada 7 días suplementada con *L. casei* (10(9) cél/día/ratón) los 2 últimos días de renutrición (LC). Al final de cada período, estos animales, controles bien nutridos (N) y desnutridos (D) fueron desafiados intranasalmente con *S. pneumoniae* (10(3) cél/ratón, dosis que produce infección sin sepsis). Los días 1, 5 y 10 post-infección se determinaron: peso; cultivo de pulmón; recuento total y diferencial de leucocitos en sangre periférica y fluido broncoalveolar (BAL); actividad fagocítica de macrófagos alveolares (AFMA) por método del Nitroblue Tetrazolium e IgA e IgG anti-estreptococo en suero y BAL por ELISA. Todas las dietas incrementaron significativamente el peso de los animales desnutridos ($N=25 \pm 1g$; $D=10 \pm 1$; $DB=23 \pm 0,4$; $LC=24 \pm 1$). Los animales tratados con LC se comportaron como los normales en todos los parámetros estudiados, con diferencias significativas con respecto a DB ($p < 0,05$) (recuento de bacterias: $N=2,4 \pm 0,2 UFC/g$; $D=4,9 \pm 0,4$; $DB=4,0 \pm 0,5$; $LC=2,8 \pm 0,9$; neutrófilos en BAL: $N=181 \pm 2$ cél/ul; $D=86 \pm 1$; $DB=110 \pm 2$; $LC=150 \pm 1$; AFMA: $N=63 \pm 1\%$; $D=48 \pm 1$; $DB=52 \pm 1$; $LC=68 \pm 1$; IgA en BAL: $N=1,73 \pm 0,02$ DO/200ul; $D=0,90 \pm 0,01$; $DB=1,40 \pm 0,01$; $LC=1,88 \pm 0,01$; IgG en BAL: $N=1,46 \pm 0,01$ DO/200ul; $D=0,69 \pm 0,02$; $DB=0,93 \pm 0,01$; $LC=1,50 \pm 0,0$) La adición de *L. casei* a la dieta de renutrición de 7d, es eficiente para normalizar la respuesta inmune de los ratones desnutridos frente a una infección respiratoria

con *S. pneumoniae*. Este efecto se alcanza con 21 días de administración de DB.

172. (3889) APLICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES AL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS. SERRADELL, MARIA DE LOS ANGELES; NEGRONI, RICARDO; FOSSATI, CARLOS ALBERTO

Cátedra de Inmunología - Facultad de Ciencias Exactas - UNLP Centro de Micología - Facultad de Medicina - UBA

La paracoccidiodiomicosis (PCM) es una micosis sistémica endémica de Latinoamérica, producida por el hongo *Paracoccidiodioides brasiliensis* (PB). El diagnóstico de certeza se realiza por observación microscópica y posterior aislamiento e identificación del hongo. Sin embargo, las pruebas serológicas han sido una herramienta útil, por su rapidez y sencillez, para el diagnóstico indirecto de esta micosis. A su vez es importante realizar el diagnóstico diferencial con histoplasmosis (HP), debido a la superposición de áreas endémicas y al tipo de patología que se presenta. El objetivo del siguiente trabajo fue desarrollar métodos de detección de anticuerpos empleando anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos y evaluar su utilidad en el diagnóstico de PCM. Se analizaron sueros de pacientes con PCM crónica y aguda (51), con HP (38), con aspergilosis (4), con candidiasis (2), y de individuos sanos (20) por ELISA indirecto y por inmunoblotting (IB) frente a un extracto celular de PB, y por ELISA de captura empleando dos AcMo anti-PB (clones 2C3 y 3F9). El ELISA indirecto mostró una sensibilidad del 96% y una especificidad del 65,6%. Los ensayos de captura con los AcMo resultaron menos sensibles (2C3: 70,6%; 3F9: 78,4%), pero más específicos (2C3: 81,6%; 3F9: 87,5%) que el ensayo indirecto. Sólo el ensayo con el AcMo 3F9 mostró diferencias de reactividad entre pacientes con PCM crónica y aguda. Por IB, 50 de los 51 pacientes con PCM revelaron un gran número de bandas en el extracto de PB, mientras que solo 11 de los sueros de pacientes con otras micosis revelaron principalmente una banda de 50 kDa en el mismo extracto. Por lo tanto, en base a los parámetros de sensibilidad y especificidad de los ensayos desarrollados, puede deducirse que ante un resultado negativo por ELISA de captura y sospecha de PCM, se podría recurrir al ensayo de IB para una confirmación rápida del diagnóstico presuntivo.

173. (3891) MUTANTE DAM (DNA ADENINA METILASA) DE SALMONELLA ENTERITIDIS COMO POTENCIAL CEPA VACUNA/VECTOR. SARNACKI, SEBASTIAN HERNAN; GIACOMODONATO, MONICA NANCY; CACCURI, ROBERTO; SISTI, FEDERICO; CERQUETTI, MARIA CRISTINA

CEFYBO-CONICET Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, Dpto. Microbiología, Parasitología e Inmunología.

Las cepas atenuadas de *Salmonella* spp. han dado origen a una nueva estrategia para el tratamiento de tejidos neoplásicos. Estas bacterias se multiplican en forma selectiva en tumores inhibiendo así su crecimiento. Las cepas de *S. typhimurium* que carecen totalmente de la proteína Dam se han propuesto como las mejores vacunas contra la salmonelosis ya que son incapaces de invadir enterocitos o de causar citotoxicidad. Estas características, sin embargo, no permitirían su uso como vectores para el transporte de proteínas terapéuticas hacia los tumores. Hemos obtenido una mutante dam de *S. enteritidis* (SD1) que no carece totalmente de Dam, sino que porta una proteína defectuosa (diez aminoácidos más corta) y muestra un fenotipo "leaky" presentando ADN con adeninas metiladas y no metiladas. SD1 resultó ser altamente inocua en el ratón [DL₅₀] oral >10(9) cfu) y además protectora. Los ratones Balb/c inmunizados con 10(10) cfu de SD1 depuraron del bazo a la cepa virulenta de *S. enteritidis* más eficientemente que los animales controles. Asimismo, un 40% de los animales inmunizados sobrevivieron al desafío con la cepa salvaje de *S. enteritidis*. Se encontró que SD1 induce in vivo ni-

veles significativos ($p < 0.01$) de IFN-gamma ?intestinal determinados por ELISA; (509 + 62 pg/ug de proteínas en animales inmunizados vs 308 + 20 pg/ug de proteínas en los controles). La microscopía electrónica reveló cambios histológicos en placas de Peyer's (PP), sugiriendo que SD1 es capaz de inducir citotoxicidad e invadir PP luego de la inoculación dentro de una ligadura del íleo. En concordancia con estos resultados, mediante la técnica de Western blot, se encontró que SD1 expresa proteínas de invasión (SipA, SipB y SipC). La proteína Dam regula la expresión de genes. La delección de los últimos 10 aminoácidos de esta proteína en la mutante SD1 de *S. enteritidis* originó una cepa inocua pero invasiva, resultando adecuada como potencial vacuna/vector.

174. (3918) INMUNOGENICIDAD Y CAPACIDAD PROTECTORA DE VACUNAS CELULARES Y ACELULARES DE CLOSTRIDIUM SEPTICUM. CORTIÑAS, TERESA INES; MATTAR, AIDA; BALMACEDA, VALERIA; DI GENARO, SILVIA; STEFANINI DE GUZMAN, ANA

Area Microbiología, Univ. Nacional de San Luis

Clostridium septicum es el agente causal de infecciones traumáticas (edema maligno) en animales e infecciones no traumáticas en el hombre, asociadas a cáncer de colon o inmunodeficiencias. Generalmente la enfermedad evoluciona con un alto índice de mortalidad. Para prevenir pérdidas en el ganado se emplean vacunas clostridiales polivalentes, que incluyen el toxoide alfa, considerado el principal antígeno protector de *C. septicum*, sin embargo las mismas, no siempre inducen una protección total contra este microorganismo. El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad inmunoprotectora e inmunogenicidad de proteínas celulares y acelulares de dos cepas *C. septicum*. Se emplearon como inmunógenos (1) sobrenadantes liofilizados (SL); (2) sobrenadantes parcialmente purificados y concentrados por ultrafiltración (SPP); (3) células sonicadas (CS) y (4) cultivos enteros sonicados (CES). Los inmunógenos fueron obtenidos una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento. La respuesta inmunogénica se valoró mediante test de ELISA y la capacidad protectora por ensayos de protección en ratón. Se obtuvo una buena correlación entre título de ELISA y concentración de antígeno empleado, observándose una total protección en animales con título superior a 100. Los resultados demostraron una mayor capacidad protectora de SPP (100% de protección hasta la dilución 1:100) con respecto a SL (60% de protección sin diluir) ($p > 0.05$) y una mayor protección de CS (100% de protección a la dilución 1:100) que CES. Los resultados obtenidos indican que las sonicadas celulares aportan antígenos protectores cuya inclusión en la formulación de vacunas debería ser tenida en cuenta. Además ponen de manifiesto la importancia de incluir antígenos libres de las proteínas del medio de cultivo, de manera de evitar respuestas inespecíficas que compiten con los antígenos protectores del microorganismo.

175. (3932) ROL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCS) Y RECEPTORES DE TIPO TOLL EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO (MMTV). I. EFECTO DEL MMTV SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LAS DCS. BURZYN, DALIA; LOMBARDI, GABRIELA; GARGINI, RICARDO; RASSA, JOHN; KIM, DAVID; NEPOMNASCHY, IRENE; ROSS, SUSAN; PIAZZON, ISABEL

ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, IHEMA, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires Department of Microbiology and Cancer Center, University of Pennsylvania

El virus del tumor mamario murino (MMTV) es un retrovirus transmitido a través del amamantamiento que utiliza el sistema inmune para establecer la infección. Aunque la importancia de los linfocitos B y T durante la infección es conocida, el rol de las células dendríticas (DCs) es menos claro. Habíamos demostrado que el MMTV induce la secreción de TNF α e IL-6 en DCs derivadas

de médula ósea (BMDCs) por unión al receptor de tipo toll-4 (TLR4). Se cultivaron BMDCs de ratones: a) C3H/HeN y b) C3H/HeJ (mutantes para TLR4, TLR4Lps-d/TLR4Lps-d) con el virus y 18hs después se analizó por citofluorometría la expresión de moléculas coestimuladoras. El MMTV aumentó la expresión de CD80 y CD40 en BMDCs de C3H/HeN y este efecto se vio muy reducido en BMDCs de C3H/HeJ: CD80 (intensidad media de fluorescencia \pm SD, n=3): a) 39 \pm 4 (con MMTV) vs 10 \pm 1 (sin MMTV) y b) 15 \pm 2 vs 10 \pm 0,9; CD40: a) 340 \pm 45 vs 41 \pm 6 y b) 110 \pm 10 vs 19 \pm 5. Se estudió la expresión de genes de quemoquinas mediante ensayos de protección de RNasa. Las BMDCs de C3H/HeN, no así las de C3H/HeJ, mostraron aumentos en la expresión de MIP-1a, MIP-1b, MIP-2, RANTES e IP-10 luego de la incubación con MMTV. Dado que algunas de estas moléculas atraen DCs o sus precursores, investigamos si durante la infección natural se producen cambios en las DCs de las placas de Peyer (PP). Se amantaron crías: a) C3H/HeN y b) C3H/HeJ con nodrizas infectadas o libres de virus. La infección indujo aumentos en el porcentaje y número absoluto de células CD11c+ (DCs) en PP de crías C3H/HeN pero no en las C3H/HeJ (media del porcentaje \pm SD, n=3): a) 5,6 \pm 1 (con MMTV) vs 2,3 \pm 0,2 (sin MMTV), p<0,01; b) 1,7 \pm 0,4 vs 1,9 \pm 0,5. Los resultados sugieren que la interacción entre el MMTV y el TLR4 induce cambios en las DCs tanto in vitro como durante la infección in vivo.

176. (3934) ROL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCS) Y LOS RECEPTORES DE TIPO TOLL EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO (MMTV). II. EL MMTV AUMENTA EN LAS DCS LA EXPRESIÓN DE SU RECEPTOR DE ENTRADA. BURZYN, DALIA; RASSA, JOHN; KIM, DAVID; ROSS, SUSAN; NEPOMNASCHY, IRENE; PIAZZON, ISABEL

ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires Department of Microbiology and Cancer Center, University of Pennsylvania

Recientemente se ha demostrado que el receptor de transferrina 1 (CD71) es el receptor de entrada a la célula del MMTV. Estudiamos por citofluorometría la expresión de CD71 en BMDCs de ratones C3H/HeN estimuladas 18 hs con MMTV. Los resultados, expresados como la intensidad media de fluorescencia, media \pm SD, n=3, mostraron que el virus incrementó la expresión de su receptor: 33 \pm 2,1 (con MMTV) vs 13 \pm 1 (sin MMTV). Este incremento fue menor en BMDCs de ratones C3H/HeJ (TLR4Lps-d/TLR4Lps-d): 29 \pm 2,2 (con MMTV) vs 17 \pm 1,2 (sin MMTV) y en BMDCs de ratones knock out para TLR2 (TLR2-/-): 36 \pm 2,9 (con MMTV) vs 20 \pm 2,0 (sin MMTV). No se observó ningún efecto del virus en BMDCs derivadas de ratones TLR4Lps-d/TLR4Lps-d, TLR2-/- (con receptores TLR4 no funcionales y sin receptores TLR2): 20 \pm 1,9 (con MMTV) vs 24 \pm 2,1 (sin MMTV). Mediante ensayos de PCR para detectar integración viral observamos que el MMTV fue capaz de infectar a las BMDCs de C3H/HeN. La infección fue bloqueada por un anticuerpo monoclonal anti-CD71. En las BMDCs de ratones TLR4Lps-d/TLR4Lps-d, TLR2-/- la infección se vio disminuida. Resultados de experimentos in vivo mostraron que el amantamiento de crías C3H/HeN con leche infectada con MMTV durante tres días indujo un aumento en el porcentaje de DCs de placas de Peyer (PPs) que expresan CD71 (media del porcentaje de CD71+/CD11c+ \pm SD, n=3): 38,4 \pm 0,9 (con MMTV) vs 25,1 \pm 2,0 (sin MMTV); p<0,01. Por el contrario, la infección de ratones C3H/HeJ; TLR2-/- o TLR4Lps-d/TLR4Lps-d, TLR2-/- no indujo alteraciones en la población de DCs. En conjunto estos resultados sugieren que la señalización del MMTV a través de los TLRs juega un rol importante en la infección de las DCs por MMTV.

177. (3935) AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE CCL4 Y EN EL NÚMERO DE CÉLULAS CD4+CD25+ EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO. GARGINI, RICARDO; BURZYN, DA-

LIA; VERCELLI, CLAUDIA; COSTA, HÉCTOR; MUNDIÑANO, JULIANA; NEPOMNASCHY, IRENE; PIAZZON, ISABEL

ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

El virus del tumor mamario murino (MMTV) se transmite por leche y es transportado al epitelio mamario por linfocitos. En etapas tempranas de la infección, el virus activa células dendríticas (DCs) y linfocitos B de las Placas de Peyer (PPs) vía interacción con el receptor de tipo toll-4 (TLR4). Dichas células son infectadas y expresan el superantígeno (Sag) viral que luego presentan a las células T Vbeta (Vb) específicas. En nuestro laboratorio hemos observado que la activación de DCs in vitro por MMTV induce la secreción de CCL4, quemoquina característica de la atracción de células regulatorias CD4+CD25+ (Tr). Se investigó el efecto del MMTV sobre células CD4+CD25+ en PP a los 2 días de infección. Los resultados -expresados como la media del n° de células CD4+CD25+/placa \pm SD (x10-3) (n=6)- fueron: 1,52 \pm 0,6 en crías infectadas vs 0,54 \pm 0,36 en crías no infectadas (p<0,01). Se detectó por RT-PCR un aumento de CCL4 en las PPs de animales infectados. Para investigar si el aumento de células CD4+CD25+ es independiente de la respuesta al Sag, ratones (AKR/JxBALB/c)F1 fueron retrocruzados con ratones BALB/c para obtener crías que poseen o no clones T reactivos al Sag (Vb6+ o Vb6-). Las crías fueron amantadas durante 2 días con madres: a) infectadas y b) no infectadas. Los resultados -expresados como la media del n° de células CD4+CD25+/placa \pm SD (x10-3) (n=5) fueron: a) 2,7 \pm 1,4 (Vb6+) vs 2,0 \pm 1,08 (Vb6-) (NS) y b) 0,52 \pm 0,4 (Vb6+) vs 0,45 \pm 0,2 (Vb6-) (NS). Estos resultados sugieren que existe un aumento de las células CD4+CD25+ en PPs de ratones infectados con el MMTV que no depende de la respuesta frente al Sag. Dicho aumento correlaciona con un incremento de CCL4 inducido por el virus.

178. (4016) CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y BIOFÍSICA DE LOS SUPERANTÍGENOS (SAGS) DE S. AUREUS SEG Y SEI. FERNÁNDEZ¹, MARISA M; DEMARZI¹, MAURICIO C; BERGUER², PAULA; BURZIN², DALIA; GANEM¹, BERNARDA; MARIUZZA³, ROY A; PIAZZON², ISABEL; MALCHIODO¹, EMILIO L

Cat de Inmunología-Fac de Farmacia y Bioquímica-UBA-IDEHU-CONICET ²Academia Nacional de Medicina, ³ Center for Advanced Research in Biotechnology

Los SAGs son toxinas, producidas principalmente por *S. aureus* y *S. pyogenes*, que poseen importantes propiedades inmunostimuladoras debido a su capacidad de interactuar simultáneamente con las moléculas del CMH de clase II, sin ser procesados intracelularmente, y con la porción variable de la cadena β de ciertas familias de TCRs. Esta característica hace que estimulen hasta un 20% de los linfocitos T totales, liberando citoquinas proinflamatorias y produciendo un cuadro clínico conocido como Síndrome de Shock Tóxico, el cual puede ser letal. Con el fin de caracterizar bioquímica y biofísicamente a SEG y SEI, dos SAGs de *S. aureus*, los clonamos y expresamos en *E. coli*. La afinidad de SEI por las cadenas β humanas: 1, 2.1 y 5.2. se estudió empleando resonancia plasmática de superficie e inmovilizando el Sag al biosensor. Las constantes de disociación (KD) calculadas fueron: 1.1, 6.3 y 78.7 μ M respectivamente. La capacidad superantigénica y la especificidad de ambos SAGs por los TCRs de ratón se estudió por inoculación en la almohadilla plantar y análisis de las células expandidas en el ganglio, por citometría de flujo. SEI interaccionaría con: V β -3, 5 y 13 y SEG con V β 7 y 9. Concluimos que SEI tiene 10 veces mayor afinidad por hV β 1 y hV β 2.1 (aunque no está descrito que expanda a los LT que expresan este último TCR) que por hV β 5.2. Por otro lado, las familias mV β 7 y 9 en ratón son escasas, por lo que a pesar que obtuvimos aumentos de hasta un 70% respecto del basal, la especificidad de SEG por estas cadenas debe ser confirmada por RT-PCR.

INMUNOLOGÍA V

- 179. (3463) LA PRESENCIA DE LINFOCITOS T Y B MODIFICA EL EFECTO DEL NEUROPEPTIDO Y SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON. CAMBIOS CON LA EDAD.** PUERTO, MARTA; GUAYERBAS, NOELIA; ALVAREZ, PEDRO; PÉREZ LEIRÓS, CLAUDIA; DE LA FUENTE, MÓNICA

Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, CONICET

Los neurotransmisores como el neuropéptido Y (NPY) modulan diversas funciones inmunitarias, con distintos efectos según las células estudiadas y la edad de los animales de los que éstas proceden. Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la presencia de linfocitos T y B en la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales, en presencia o ausencia (controles) de NPY (10-10 M), así como los cambios que manifiesta dicho efecto con la edad. Se emplearon ratones hembra adultos (24±2 semanas), viejos (72±2 semanas) y longevos (128±2 semanas) de la cepa BALB/c. La capacidad fagocítica se valoró mediante la ingestión de partículas inertes (bolas de látex), obteniéndose el índice de fagocitosis (I.F.) (número de bolas ingeridas por 100 macrófagos) y la eficacia fagocítica (E.F.) (% macrófagos que fagocitan). Los resultados indican que la presencia o ausencia de linfocitos T y/o B modifica significativamente la capacidad fagocítica de los macrófagos (en adultos los I.F. fueron: 181±31 en macrófagos purificados, 102±33 en macrófagos+linfocitos T, 468±56 en macrófagos+linfocitos B y 322±49 en población peritoneal total) así como el efecto del NPY sobre esa capacidad. Los resultados observados en macrófagos de animales adultos se reproducen en los de longevos, mientras que en los de los viejos, una diferente regulación de esta función por parte del NPY (I.F. 322±49 frente a 164±21 en adultas (p<0,01), 260±11 frente a 254±61 en viejas y 362±29 frente a 194±30 en longevas (p<0,01) en la población total para controles y en presencia de NPY, respectivamente). La falta de efecto del NPY en las células de animales viejos es un apoyo a la teoría del deterioro en la comunicación neuroinmune como una de las causas del envejecimiento.

- 180. (3593) LOS COMPLEJOS INMUNES (CI) INHIBEN LA EXPRESIÓN BASAL E INDUCIDA POR IFN-G DE LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I (MHC-I) EN MONOCITOS HUMANOS.** BARRIONUEVO, PAULA; BEIGIER BOMPADRE, MACARENA; DE LA BARRERA, SILVIA; FERNÁNDEZ, GABRIELA; GÓMEZ, SONIA; PALERMO, MARINA; ISTURIZ, MARTÍN

Academia Nacional de Medicina. División Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina.

Las MHC-I son esenciales en la presentación antigénica a los CD8+. Anteriormente demostramos que los CI disminuyen la expresión de las MHC-II, ICAM-1 y CD14 en monocitos humanos. En este trabajo investigamos el efecto de los CI ovaalbúmina (OA)-IgG anti-OA sobre la expresión de las MHC-I en monocitos humanos purificados. La expresión de las MHC-I fue evaluada por citometría de flujo. Los resultados demuestran que los CI inducen una drástica inhibición de la sobreexpresión de las MHC-I luego de 24 hs de incubación con IFN-g (240 U/ml). Los CI también inhibieron la expresión basal de las MHC-I. Los resultados son expresados como % de MIF del control ± SEM: a) CI:68±7; b) IFN-g:175±15; c) CI+IFN-g:84±15; n=5; a) vs control p<0,01; b) vs c) p<0,01. El N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), un poderoso agente quimiotáctico, no modifica la expresión de las MHC-I. La inhibición de la expresión de las MHC-I correlacionó directamente con la respuesta citotóxica, medida en un ensayo de citotoxicidad dependiente de la expresión de estas moléculas. Los resultados,

expresados como % de lisis de un experimento representativo fueron: a) control:85; b) CI:40; c) IFN-g:114; d) CI+IFN-g:56. Teniendo en cuenta que los CI son capaces de inducir eventos secretorios en los monocitos, evaluamos el efecto de los sobrenadantes (SN) de células mononucleares tratadas con CI sobre la expresión de las MHC-I. El resultado expresado como % de MIF del control ± SEM fue 68±3 (p<0,01 versus control; n=5). Los SN de polimorfonucleares (PMN) tratados con CI también fueron capaces de inhibir la expresión de las MHC-I. Estos resultados nos permiten concluir: 1) Los CI inducen una drástica disminución de las MHC-I, 2) El efecto de los CI es mediado por productos liberados por las células mononucleares y PMN.

- 181. (3710) ESTUDIO DE LAS MOLÉCULAS COESTIMULADORAS DEL RCT, CD40 Y CD80, EN EL RECHAZO TUMORAL.** RUYBAL, PAULA; GRAVISACO, MARÍA JOSÉ; BARCALA, VIRNA; WALDNER, CLAUDIA; MONGINI, CLAUDIA

CEFAYO (CONICET) CITOMLAB-HOSPITAL ITALIANO

La activación de los linfocitos T requiere de tres señales sinérgicas: la presentación de antígenos del tumor por moléculas del CMH, señales producidas por moléculas coestimuladoras del Rct (CD80,CD40) y señales de propagación (citoquinas). El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antitumoral in vivo de la administración de células tumorales transfectadas para expresar CD40 (LBC.40), CD80 (LBC.80) y diferentes proporciones de las mismas. Células del linfoma LBC fueron transfectadas con los plásmidos de expresión para las moléculas CD40 ó CD80. Las curvas de sobrevida se realizaron con lotes de 6 ratones BALB/C inoculados i.p con 10(6) células LBC, LBC.40, LBC.80 ó combinaciones de las mismas entre 25 y 75%. El 100% de los ratones inoculados con células LBC o transfectadas con el plásmido Mock (LBC.mock) murieron con un tiempo medio de sobrevida (TM50) de 18 días. El 80 y 60% de los ratones inoculados con LBC.80 ó LBC.40, respectivamente, sobrevivieron a los 270 días post-inoculación. El TM50 de los ratones inoculados con LBC.40 ó LBC.80 fue de 22.5 y 27.5 días respectivamente. Como con las moléculas CD40 y CD80 no se logró una sobrevida del 100% estudiamos si el efecto protector se vería sinergizado por la co-inoculación de células LBC.40 y LBC.80. Tres combinaciones de estas células y LBC fueron inoculadas con un número total de 10(6) células en lotes de 6 ratones. La combinación no aumentó el efecto de cada una por separado, observándose mayor tiempo de sobrevida a mayor proporción de células LBC.80 inoculadas tanto en presencia de células LBC o de LBC.40. Demostramos que la neo-expresión de CD40 y en particular de CD80 en las células LBC protege contra el desarrollo del tumor, aunque el efecto protector producido por cada una de dichas moléculas no pudo ser potenciado al inocular ambas moléculas. La transfección de células tumorales con moléculas coestimuladoras podría ser usada como estrategia de terapia génica antitumoral.

- 182. (3777) EXPRESIÓN DE RECEPTORES PARA QUIMIOQUINAS EN LINFOCITOS T CD4+ DE PACIENTES CON SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO ASOCIADO AL CROMOSOMA X (XLP).** BELMONTE, LILIANA; PARODI, CECILIA; RUIBAL-ARES, BEATRIZ; FELIPPO, MARTA; MALBRÁN, ALEJANDRO; E DE BRACCO, MARÍA M

*IIHema, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires y *Hospital Británico de Buenos Aires*

El síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP) es una rara y grave inmunodeficiencia primaria asociada a mutaciones del gen SH2D1A. En este trabajo analizamos el fenotipo de la población linfocitaria T en 2 pacientes (#4 y #9) con XLP e hipogamaglobulinemia secundaria a la infección inicial con virus de Epstein Barr. Los estudios fenotípicos de los linfocitos T se realizaron por citometría de flujo más de 2 años después del evento desencadenante, utilizando sangre total de XLP y normales (N), lisis hipotónica y los siguientes anticuerpos monoclonales: anti CD3, CD4, CD8, CCR5, CCR7, CXCR3, CCR4. Los dos pa-

cientes fueron estudiados periódicamente durante 2 años. Los resultados demostraron un sostenido descenso de los linfocitos T CD4+ con aumento en los T CD8+ (X \pm SEM, CD4,CD3: XLP#4, 19.5 \pm 1.0; XLP#9, 16.3 \pm 0.9; N, 43.2 \pm 2.5; CD8,CD3: XLP#4, 66.7 \pm 2.0; XLP#9, 64.5 \pm 0.7; N, 21.9 \pm 2.4, n=10). La expresión de receptores para quimioquinas fue muy diferente en linfocitos T CD4+ de pacientes XLP que en N. Las CD4+ de XLP tuvieron mayor expresión de receptores asociados a células Th1 de memoria: CCR5 y CXCR3 que los controles. Por el contrario, la expresión del receptor de memoria Th2: CCR4 y el del receptor de células "naive" o con capacidad de migración a ganglios linfáticos: CCR7, fueron inferiores al de los N (X \pm SEM CCR5,CD4/CD4 %: XLP, 40.2 \pm 6.4; N, 10.0 \pm 2; CXCR3,CD4/CD4 %: XLP, 60.2 \pm 2; N, 36.6 \pm 4; CCR4,CD4/CD4 %: XLP, 2.2 \pm 0.7; N, 30.0 \pm 3; CCR7,CD4/CD4 %: XLP, 34.5 \pm 4; N, 82.0 \pm 6, n= 4-6). En XLP, los linfocitos T CD4+ tiene alteraciones en la expresión de receptores de "homing" linfocitario y cambios en el balance Th1/Th2 probablemente relacionados a la génesis de la hipogamaglobulinemia.

183. (3787) DEFECTOS EN LAS CELULAS B DE MEMORIA EN PACIENTES HIPOGAMAGLOBULINÉMICOS CON SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO ASOCIADO AL CROMOSOMA X. MALBRÁN, ALEJANDRO; BELMONTE, LILIANA; E. DE BRACCO, M. MARTA; RUIBAL-ARES, BEATRIZ

Servicio de Alergia e Inmunología, Bs As Hospital Británico; IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

El síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP) se produce por la deficiencia del gen SH2D1A y se expresa luego de la infección por el virus de Epstein Barr (EBV). En este trabajo estudiamos la evolución de dos pacientes XLP que sobrevivieron a la infección inicial con EBV y desarrollaron hipogamaglobulinemia grave con requerimiento mensual de gama globulina. El paciente XLP#9 pudo ser estudiado antes y después (2 años) del episodio agudo de mononucleosis infecciosa por EBV y su hermano XLP#4 luego de 35 años del diagnóstico de la deficiencia. Se analizó la concentración de inmunoglobulinas (Igs) séricas por nefelometría, el porcentaje de linfocitos B (CD19+) y la proporción de linfocitos B de memoria (CD27,CD19/CD19%) por citometría de flujo. El paciente XLP#9 desarrolló inicialmente un aumento en la concentración sérica de Igs con aparición de un componente monoclonal IgG-?, seguida de un descenso progresivo de los niveles de Igs hasta alcanzar <500 mg% IgG y <10 mg % de IgM e IgA a los 4 meses de la infección por EBV. En XLP#9, los linfocitos B fueron inicialmente <0.5% debido al tratamiento con Rituximab recibido en la fase aguda, pero después de los 2 años alcanzaron los niveles de XLP#4 que no había sido tratado con Rituximab (CD19+ %, XLP#9: 2.9+0.2; XLP#4: 2.6+0.1), significativamente inferiores a los de los controles normales N (CD19+ %, N: 12.0+1.4, p<0.001). La proporción de linfocitos CD19 que expresaban el marcador de memoria CD27 fue inferior en pacientes XLP que en N (CD27,CD19/CD19 %, XLP#9: 7.02+1.16; XLP#4: 14.8+1.9; N: 43.3+3.3, n=8, p<0.01). La hipogamaglobulinemia en XLP se asocia a la reducción de linfocitos B de memoria, células que han enfrentado antígeno en los centros germinales.

184. (3928) ALTERACIONES EN LA LINFOPOYESIS EN RATONES MUTANTES PARA L-CATEPSINA. LOMBARDI, GABRIELA; BURZYN, DALIA; COSTA, HÉCTOR; AIXALÁ, MÓNICA; MEISS, ROBERTO; PIAZZON, ISABEL; NEPOMNASCHY, IRENE

ILEO - Acad. Nac. de Medicina de Buenos Aires

Los ratones nact son deficientes en L-catepsina. Habíamos observado un incremento en la celularidad de los ganglios linfoides periféricos de estos mutantes, con aumentos significativos en la población T CD8+. Se observó un aumento significativo en el porcentaje y en el número absoluto de linfocitos B220+ en los ganglios de estos ratones: (29 \pm 3 vs. 21 \pm 4 (p<0.001) (media del % \pm SD,

n=10) y (5.2 \pm 2.1)x106 vs (1.9 \pm 0.9) x106 (p<0.0001) (media del N \pm SD, n=10)). Estos aumentos se registraron también en el bazo y no fueron acompañados por alteraciones en los niveles de proliferación y apoptosis basal de esta subpoblación linfocítica. Mediante técnicas histológicas investigamos la celularidad de la médula ósea. La tinción con hematoxilina-eosina de cortes de hueso femoral permitió observar un aumento significativo en el número de células hematopoyéticas presentes en la médula ósea de los ratones mutantes: (428 \pm 10) vs (350 \pm 10) (p<0.05) (media del N \pm SD en 10 campos x1000, n=5.). El análisis mediante un contador hematológico (Cell DYN 1700) de muestras de sangre periférica indicó que el porcentaje de neutrófilos se encontraba aumentado en los mutantes: 29.7 \pm 7.5 vs 18.6 \pm 4.9 (p=0.02) (media del % \pm SD, n=6). Se observó además por tinción con azul brillante de cresilo un aumento en el número de reticulocitos en sangre periférica de los mutantes: (426 \pm 94) x106/ml vs (199 \pm 47) x106/ml (p<0.05) (media del N \pm SD, n=3) sugiriendo un aumento en la eritropoyesis. Los resultados sugieren que los mutantes para catepsina -L muestran aumentos en la producción de células hematopoyéticas en médula ósea, que se reflejan en aumentos en la celularidad de los ganglios linfoides, en el número de neutrófilos en sangre periférica y en la actividad eritropoyética.

185. (3951) PARTICIPACIÓN DE LA TSH EN LOS EFECTOS MODULATORIOS INDUCIDOS POR EL HIPOTIROIDISMO EN LA RESPUESTA INMUNE MURINA. KLECHA, ALICIA; BARREIRO ARCOS, MARÍA LAURA; GORELIK, GABRIELA; CREMASCHI, GRACIELA

Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA CEFyBO-CONICET

Fue descripto un rol inmunoregulatorio para las hormonas tiroideas. Las evidencias que demuestran la modulación de la respuesta inmune por el hipotiroidismo son controvertidas. El objetivo de este trabajo fue analizar esta regulación en estados de hipotiroidismo con diferentes niveles séricos de TSH. Se emplearon ratones BALB/c eutiroides (Eu) e hipotiroides, obtenidos por tratamiento con propiltiouracilo (PTU) durante 15, 20 o 30 días (P15, P20 y P30). Se desarrolló un RIA para medir los niveles de TSH en suero en ng/ml: Eu: 45 \pm 5; P15: 58 \pm 4; P20: 78 \pm 4*; P30: 146 \pm 11*, *p<0.05. Se inmunizaron con LPS y GRC, 7 y 14 días antes de ser sacrificados n=5 animales de cada grupo. Luego de la 1er inmunización, se determinaron los títulos de anticuerpos (Ac) por hemaglutinación: anti-LPS: P15=P20=1/80 que difieren significativamente de Eu= 1/320 y anti-GRC: P15=Eu=1/160 y P20=1/320. Títulos de Ac (IgM anti-LPS e IgG anti-GRC, respectivamente) luego de la 2da inmunización se determinaron por ELISA siendo significativamente mayores para P30 que Eu en ambos casos. La proliferación linfocitaria en respuesta a mitógenos T (Con A, 2 μ g/ml) o B (LPS, 15 μ g/ml) fue evaluada por incorporación de [³H]-timidina. Los resultados se expresaron como índice de estimulación (IE) (relación entre las dpm con mitógeno y basal): IE para LPS: Eu:50 \pm 4; P15:30 \pm 5*; P20:70 \pm 7*; IE para Con A: Eu:45 \pm 3; P15:20 \pm 2*; P28:60 \pm 5*, p<0.05 respecto del correspondiente Eu. El agregado de TSH (10 y 100 ng/ml) aumentó significativamente la proliferación inducida por Con A de linfocitos Eu (IE Con A= 25 \pm 2; TSH 10 = 35 \pm 4* y TSH 100= 33 \pm 3*, p<0.05). Podemos concluir que la reducción de los niveles séricos de hormonas tiroideas disminuye tanto la proliferación linfocitaria como la producción de anticuerpos específicos, efectos revertidos por el aumento de TSH.

NEFROLOGÍA II

186. (3368) IECA Y BLOQUEANTE AT1 EN COMBINACIÓN OFRECEN UN MEJOR CONTROL DEL DAÑO RENAL EN LA EN RATA OBESA ZUCKER. TOBLLI, JORGE; DEROSA, GRACIELA; CAO, GABRIEL; PIORNO, PABLO; PAGANO, PATRICIA

Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán

En este estudio se evaluó si la combinación de un IECA, Benazepril (B) con un bloqueante AT1, Irbesartan (IR), en baja dosis es tan efectiva o más que cada droga individualmente a mayor dosis en el control del daño renal en rata obesa Zucker (OZR). Durante seis meses, G1 (OZR sin tratamiento), G2 (OZR con B 10 mg/kg/día); G3 (OZR con IR 50mg/kg/día), y G4 (OZR con B 5mg/kg/día + IR 25mg/kg/día). Tejido renal se procesó para Microscopía Óptica e IHQ utilizando alfa-smooth-muscle-actin (alfa-SMA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), y colágeno (COL) I, III y IV. Todos los grupos tratados presentaron similar control en la presión arterial. Los animales del G4 (B+IR) mostraron mejor control de proteinuria y mayor clearance de creatinina. Además, G4 mostró significativo ($p < 0.05$): 1) menor área glomerular; 2) menor glomerulosclerosis; 3) menor % de atrofia tubular, fibrosis y α -SMA intersticial; 4) menor score de PAI-1; 5) menor % de COL I, III y IV en intersticio renal, y 6) menor relación pared/luz en vasos renales, comparado con los otros grupos. OZR tratadas con B y/o IR mostraron mejor ($p < 0.01$) perfil metabólico de carbohidratos y lípidos comparado con OZR no tratadas. Estos resultados sugieren que la combinación de B y IR, en dosis bajas es más efectiva que cada fármaco individualmente en dosis mayor para controlar el daño renal en este modelo de síndrome metabólico.

187. (3481) EFECTO DE ENDOTELINA-3 (ET-3) SOBRE LA EXPRESIÓN DE AQUAPORINA 2 (AQP2) EN RIÑÓN DE RATA WISTAR. MAJOWICZ, MÓNICA PATRICIA; ALBERTONI BORGHESE, M. FLORENCIA; VIDAL, NORBERTO A.

Cátedra de Biología Celular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Investigamos el efecto de ET-3 sobre la expresión renal de AQP2 in vitro e in vivo. In vitro: los riñones se incubaron con Krebs (control [C]) o ET-3 0.1 μ M durante 1 h a 37°C; n=4. In vivo: se trabajó con 3 grupos: C (0.09 ml/min de solución salina [S]), ET-3 dosis baja (5 ng/Kg/min) y ET-3 dosis alta (50 ng/Kg/min), n=5. Primero se infundió S mediante una bomba a través de la vena yugular 45 min para estabilizar el animal. Luego se infundió S o ET-3 durante 60 min; se sacrificaron los animales y se extrajeron los riñones, que luego de la fijación e inclusión se cortaron con un micrótopo en secciones de 4 μ . La AQP2 se identificó mediante una técnica inmunohistoquímica usando un anticuerpo policlonal de conejo anti AQP2, un anticuerpo secundario biotinilado de burro anti conejo, y se reveló con estreptavidina y diaminobencidina. Los cortes se analizaron contando las células marcadas en 10 campos con un microscopio óptico de campo claro a 1000x en corteza, médula (M) y papila (P), mediante la técnica de simple ciego. Resultados: in vitro: la incubación con ET-3 aumentó la expresión de AQP2 en M y P, siendo más notable en P: (11.10 \pm 1.24* y 46.02 \pm 1.17*** vs 5.37 \pm 0.74 y 21.27 \pm 2.46, para M y P, experimental y C respectivamente.); in vivo: la administración de ET-3, tanto en dosis baja como alta produjo resultados similares: (12.15 \pm 1.04*** y 14.17 \pm 1.12*** vs. 6.62 \pm 0.71 y 3.34 \pm 0.60, para M y P con dosis baja y C respectivamente) y (15.41 \pm 1.17*** y 27.93 \pm 1.26*** vs 6.62 \pm 0.71, para M y P con dosis alta y C respectivamente.) No se observaron modificaciones significativas en la corteza. Los datos se analizaron por ANOVA seguido de test de Tukey. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.001$ vs dosis baja. ET-3 aumentó la expresión de AQP2 in vivo e in vitro en M y P, lo cual indicaría aumento de su síntesis, pero no necesariamente de su translocación a la membrana por lo que este aumento no tiene porque reflejarse en cambios en la excreción urinaria.

188. (3504) ALTERACIONES DE LA EXCRECIÓN DE AGUA Y ELECTROLITOS EN RATAS CON CALCIFICACIÓN DISTROFICA. QUAGLIA, NORA; BRANDONI, ANABEL; VILLAR, SILVINA R.; PICENA*, JUAN C.; TORRES, ADRIANA M.

*Area Farmacología. Fac. de Cs. Bioq. y Farm. UNR. CONICET *Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas. Fac. Cs. Médicas. UNR*

Se observaron alteraciones renales hemodinámicas en ratas Wistar macho adultas con calcificación arterial estable, producida por una sobredosis de vitamina D3 (300000 UI/Kg.p.c.) 10 días previos al experimento. Evaluamos en este modelo el manejo renal de agua y electrolitos en presencia de sobrecarga aguda de sodio. Se trabajó con 2 grupos experimentales, control (C) (n=6) y tratado con vitamina D3 (T) (n=6). Se determinaron las excreciones fraccionales de agua (EF% H_2O), sodio (EF%Na), potasio (EF%K) y calcio (EF%Ca), empleando técnicas convencionales de clearance. Luego se extrajeron los riñones para realizar estudios histológicos y para evaluar en corteza (c) y médula (m) renal la actividad de la enzima Na,K-ATPasa (umol Pi/h/mg prot.) por espectrofotometría y el contenido de tisular de calcio total (Ca, umol/ g.tej.seco) por espectrofotometría de absorción atómica. Resultados: EF% H_2O : C= 0.53 \pm 0.02, T= 1.42 \pm 0.24*; EF% Na: C= 10 \pm 1, T= 30 \pm 4 *; EF% K: C= 28 \pm 2, T= 42 \pm 4 *; EF% Ca: C= 0.22 \pm 0.02, T= 1.05 \pm 0.01* (* $p < 0.05$). En tejido cortical no se observaron variaciones ni en la actividad de la Na,K-ATPasa ni en el contenido de calcio. Na,K-ATPasa(m): C= 17.07 \pm 0.93, T= 13.76 \pm 0.93*; Ca(m): C= 12.21 \pm 0.42, T= 14.13 \pm 0.25* (* $p < 0.05$). Los estudios histológicos revelaron una disminución del tamaño glomerular y dilatación de las asas de Henle en el grupo de animales tratados. Las alteraciones en el manejo tubular de agua y electrolitos observadas en las ratas con calcificación distrofica en presencia de sobrecarga aguda de sodio, se justificarían por el déficit de la actividad de la enzima Na,K-ATPasa en médula renal. El aumento del contenido total de calcio en médula renal podría modular la mencionada alteración. Estas modificaciones funcionales se corresponderían, en parte, con las alteraciones morfológicas descriptas.

189. (3522) PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS INVOLUCRADAS EN LA ELIMINACIÓN RENAL DE BROMOSULFOFTALEÍNA EN RATAS CON COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA. BRANDONI, ANABEL; VILLAR, SILVINA R.; STREMMEL*, WOLFGANG; TORRES, ADRIANA M.

*Area Farmacología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. CONICET *Medizinische Universitätsklinik. Heidelberg. Alemania.*

Se han observado modificaciones en la depuración sistémica de aniones orgánicos en ratas con colestasis extrahepática. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el manejo renal de bromosulfoftaleína (BSF, anión orgánico excretado principalmente por el hígado) en presencia de esta patología. La colestasis se produjo en ratas Wistar macho adultas por ligadura del conducto biliar de 21 h de duración (L, n=6). Se procesó además, un grupo de ratas Sham (S, n=7). Se determinó la depuración renal de BSF (ClrBSF, μ L/min/100g p.c.) a partir de datos obtenidos en el estudio de la farmacocinética de este anión, en el cual se administró una dosis única de BSF (10 mg/kg p.c., iv.). En membranas basolaterales de células tubulares proximales de riñón se evaluaron, mediante técnica de Western Blot, las abundancias de los transportadores de aniones orgánicos: Organic Anion Transporter 1 (OAT1, %), BSP/Bilirubin Binding Protein (BBBP, %) y Biliitranslocase (BTL, %), los dos últimos también presentes en hígado. Se observó un aumento en el ClrBSF: S= 0.93 \pm 0.19, L= 6.42 \pm 2.25*. Se obtuvo un aumento en la abundancia de los tres transportadores mencionados: OAT1: S= 100 \pm 7, L= 139 \pm 11*; BBBP: S= 100 \pm 10, L= 173 \pm 3*; BTL: S= 100 \pm 5, L= 126 \pm 5* (* $P < 0.05$). En las ratas con colestasis extrahepática se evidenció un aumento en la depuración renal de BSF. Esto se podría explicar, al menos en parte, por el aumento observado en la abundancia de transportadores que manejan este tipo de compuestos, de manera tal de compensar la deficiencia hepática excretora existente.

190. (3532) IMPORTANCIA DE LA NA-K-ATPASA CORTICAL EN LA FUNCION TUBULAR EN RATAS CON NEFROPATIA OBSTRUCTIVA. VILLAR, SILVINA R.; BRANDONI, ANABEL; QUAGLIA, NORA B.; TORRES, ADRIANA M.

Area Farmacología. Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R.. CONICET.

Cualquier proceso obstructivo del tracto urinario puede ser causa de insuficiencia renal aguda. Los mecanismos fisiopatológicos que se ponen en juego en una obstrucción ureteral bilateral (OUB) de corta duración aún no han sido aclarados. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el manejo renal de agua y electrolitos y algunas de las variables determinantes, en ratas Wistar macho adultas con OUB de 24 h. Los estudios se realizaron a: t=24 h (T24, n=5) y t=48 h (T48, n=6) postdesobstrucción. Se procesó un grupo paralelo de ratas Sham (S, n=11). Se determinaron: Urea en plasma (U, g/L), Excreciones Fraccionales de sodio, potasio y agua (EF% Na, K, H₂O) mediante técnicas convencionales de Clearance, actividad de Na-K-ATPasa cortical y medular (SPAc y SPAm, $\mu\text{mol Pi/h/mg Prot.}$) y abundancia del cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2, %) en homogenatos renales. Se usó el test de ANOVA y Newman-Keuls (*) $P < 0.05$ vs S, (#) $P < 0.05$ vs T24. U, S: 0.55 ± 0.02 , T24: $2.91 \pm 0.30^*$, T48: $1.78 \pm 0.25^* \#$; EF%Na, S: 1.4 ± 0.1 , T24: $50 \pm 12^*$, T48: $2.9 \pm 0.1 \#$; EF%K, S: 33 ± 3 , T24: $88 \pm 5^*$, T48: $78 \pm 8^*$; EF%H₂O, S: 1.0 ± 0.1 , T24: $9.9 \pm 1.6^*$, T48: $5.0 \pm 0.9^* \#$. SPAc, S: 16.0 ± 0.7 , T24: $11.9 \pm 0.7^*$, T48: $16.4 \pm 1.1 \#$. SPAm, S: 16.2 ± 0.9 , T24: $11.7 \pm 0.5^*$, T48: $12.0 \pm 0.8^*$. NKCC2, S: 100 ± 5 , T24: $67 \pm 8^*$, T48: $63 \pm 12^*$. Las alteraciones encontradas en las excreciones fraccionales de H₂O y electrolitos en T24, podrían deberse a la disminución de la expresión de NKCC2 y de la actividad de la SPAc y SPAm. El aumento de la actividad de la SPAc en T48 podría contribuir al mejoramiento en el manejo tubular de sodio y agua observado en este grupo.

191. (3534) PROGRESIÓN DE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN POSTISQUÉMICO Y CONTRALATERAL LUEGO DE UN PERÍODO DE 40 MINUTOS DE ISQUEMIA UNILATERAL TOTAL SEGUIDA DE 24 O 48 HORAS DE REPERFUSIÓN. MOLINAS, SARA; TRUMPER, LAURA; ELIAS, MARIA MONICA

UNR Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Dto. Cs. Fisiológicas. Area Farmacología-CONICET

En un trabajo anterior describimos que ratas sometidas a 40 minutos de isquemia unilateral seguida de 24 y 48 hs de reperusión mantenían un cuadro de IRA con significativa disminución de la VFG. Este trabajo analiza la función del riñón postisquémico y contralateral (CL) en dichos períodos. Se trabajó con riñones sometidos a 40 minutos de isquemia unilateral seguida de 24 (IR24) y 48 (IR48) hs de reperusión, sus contralaterales (CL24, CL48) y riñones controles (C). Luego de cateterizar vena y arteria femoral y el uréter correspondiente se estudiaron 2 períodos de Clearance. Se extrajeron los riñones, se separó corteza y médula y se midió contenido de glutatión y lipoperoxidación (LPO) en ambos tejidos. Los riñones isquémicos presentaron una capacidad funcional menor a la de los controles. VFG (ml/min/g): C: 0.96 ± 0.1 ; IR24: $0.005 \pm 0.001^*$, IR48: $0.034 \pm 0.016^*$, $p < 0,05$ vs C, n=6. Los riñones CL24 y CL48 no mostraron diferencias con los controles. El flujo sanguíneo renal (estimado como Clearance de PAH) siguió igual patrón que VFG, pero la fracción de filtración resultó significativamente elevada en IR24. Los riñones IR24 e IR48 mostraron un marcado deterioro en los parámetros tubulares estudiados. Los riñones CL24 aumentaron la capacidad de concentrar la orina asociado a un aumento en la concentración de sodio plasmático. LPO resultó aumentada en las médulas IR48 y CL48 y glutatión aumentó en cortezas IR24 y CL24. Estos resultados indican que luego de 24 y 48 hs de reperusión el riñón postisquémico presentó un deterioro severo. El riñón CL sería el encargado del mantenimiento de ciertos parámetros funcionales. Las señales liberadas durante el daño

isquémico no se transmiten al riñón CL, aunque los cambios medidos de LPO y glutatión se manifestaron en ambos riñones.

192. (3546) EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD Y ABUNDANCIA DE LAS SUBUNIDADES DE LA NA⁺,K⁺-ATPasa (NKA) EN MÉDULA RENAL DESPUÉS DE UN PERÍODO DE 40 MINUTOS DE ISQUEMIA SEGUIDA DE 24 O 48 HORAS DE REPERFUSIÓN. MOLINAS, SARA; TRUMPER, LAURA; ELIAS, MARIA MONICA

UNR Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Dto. de Cs. Fisiológicas. Area Farmacología-CONICET

En trabajos anteriores describimos que en homogenados de corteza renal provenientes de riñones sometidos a 40 minutos de isquemia unilateral seguidos de 24 o 48 hs de reperusión se observaron cambios en la abundancia de las subunidades alfa 1 y β 1 de la NKA, sin cambios en la actividad. Los respectivos riñones contralaterales (CL) no mostraron cambios. El presente trabajo muestra los datos obtenidos en el estudio de dichas subunidades y la actividad de la NKA en médulas renales sometidas al mismo tratamiento (40 minutos de isquemia unilateral seguida de 24 (IR24) o 48 (IR48) hs de reperusión). Se trabajó con homogenados de médulas de los siguientes grupos experimentales: controles (C), IR24, IR48, CL24 y CL48, n=6. Las subunidades fueron identificadas por Western blot y cuantificadas con el programa Adobe Photoshop. Los resultados indicaron una disminución de la actividad de NKA en IR48 [C: 14 ± 1 ; IR48: $10 \pm 1 \mu\text{mol Pi/h.mg prot.}$, $p < 0.05$]. La abundancia de la subunidad alfa1 aumentó en IR24 [C: 55 ± 10 ; IR24: $87 \pm 6\%$, $p < 0.05$] mientras que la subunidad β 1 disminuyó significativamente en IR24 e IR48 [C: 79 ± 10 ; IR24: $49 \pm 3^*$; IR48: $29 \pm 2^* \#$, * $p < 0.05$ vs C, # $p < 0.05$ vs IR24]. Los riñones CL no mostraron diferencias con los controles. La subunidad β 1 es esencial para la correcta actividad y localización de la NKA en las membranas, lo que podría explicar la menor actividad de la enzima en las médulas IR48. A las 24 hs la actividad de NKA es normal a pesar de una disminución de la subunidad β 1, esta cantidad sería suficiente para asegurar una normal estequiometría junto con el exceso de la subunidad alfa1 y así mantener un apropiado ensamblado de la enzima. Estas deficiencias de NKA en médula podrían ser responsables de la incapacidad total de concentrar la orina observada en los riñones isquémicos.

NEUROCIENCIAS II

193. (3515) ALTERACIONES DEL SISTEMA OPIOIDE EN LA MEDULA ESPINAL LUMBAR (MEL) DE RATAS CON DIABETES INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA (STZ). DORFMAN, VERÓNICA B.; FALETTI, ALICIA G.; BAYONA, JULIO C.; VEGA, M. CRISTINA; COIRINI, HECTOR

Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME. CEFYBO-CONICET

El sistema opioide (SO) regula numerosos procesos centrales y periféricos. Animales diabéticos así como un alto porcentaje de humanos mayores de 50 años con diabetes no controlada, sufren disfunciones sexuales. Dado que en la diabetes se han observado alteraciones en los niveles de opioides endógenos y/o de sus receptores en el cerebro, nuestro objetivo fue estudiar el SO en la MEL, en relación con una posible participación de éste en los mecanismos de erección peneana y eyaculación. Ratas macho Sprague-Dawley con diabetes inducida por STZ (D), ratas D tratadas con insulina por 10 días antes del sacrificio (I) y animales controles inyectados con vehículo (C) fueron sacrificados 4 semanas luego de iniciado el tratamiento. Utilizando cortes coronales de la MEL se determinó la presencia de receptores opioides mu en las láminas I y II de las astas dorsales mediante autorradiografía cuantitativa (3H-DAMGO 5nM ó 0,11 a 6,55nM, con o sin naloxona 10 μM). La unión específica, expresada en fmol/mg de tejido húmedo (fm) resultó menor en D que en C y fue revertida por insulina

[C: 123,1±12,7fml - D: 82,3±15,9fml - I: 112,5±10,3fml; p<0,05]. Curvas de saturación indicaron un aumento en la constante de disociación (Kd) y una disminución de la unión máxima (Bm) en animales D (Kd= C: 0,61±0,04nM - D: 2,01±0,05nM - I: 2,00±0,03nM; p<0,005; Bm= C: 190±24f - D: 160±14f - I: 130±25f; p<0,005). Utilizando homogenatos de la MEL, observamos además un aumento de beta-endorfina en los animales D (40%) determinada por radioinmunoensayo. La disminución tanto de la afinidad como en el número de los receptores mu opioides, en ésta región medular cuyas neuronas inervan la vasculatura peneana a través del nervio pélvico estimulando su dilatación, indicaría que la alteración del SO podría estar estrechamente relacionada con la fisiopatología de la impotencia sexual masculina en la diabetes. (PIP 0819/98)

194. (3590) INMUNOREACTIVIDAD A FOS Y RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES GR EN EL NÚCLEO ANTERODORSAL TALÁMICO EN RATAS SOMETIDAS A DEPRIVACIÓN MATERNA TEMPRANA Y ESTRÉS CRÓNICO. VALDEZ, DIEGO JAVIER; DALMASO, CAROLINA; RIVAROLA, MARÍA ANGÉLICA; VIVAS, LAURA; SUÁREZ, MARTA

Cátedra de Fisiología-Facultad de Cs. Exactas Físicas y Naturales-Universidad Nacional de Córdoba. Instituto de Investigación Médica "M y M Ferreyra", Instituto de Fisiología, Fac.de Cs. Médicas, UNC

El desarrollo de los mamíferos está caracterizado por un prolongado período de dependencia del cuidado materno. La presencia de la madre regula el desarrollo normal de una serie de sistemas fisiológicos en las crías, entre los cuales se encuentra el eje neuroendócrino Límbico-Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal (LHHA) el cual se activa frente a situaciones estresantes. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la privación materna y estrés crónico sobre la actividad neuronal y la expresión de receptores de glucocorticoides GR en el núcleo límbico Anterodorsal Talámico (NADT). Se utilizaron ratas hembras que fueron privadas de su madre diariamente por 4.5 hs. durante las tres primeras semanas de vida. A los dos meses de edad fueron sometidas a estrés crónico variable impredecible (EVI) - 24 días de exposición a diferentes estresores-. Se comprobó un aumento significativo en el nº de neuronas inmunoreactivas a Fos en el núcleo anterodorsal talámico tanto en animales con privación materna temprana comparado con los que no fueron privados (p<0.001), como en los animales con EVI en edad adulta (p<0.001). No se observaron diferencias en la expresión de receptores de glucocorticoides GR en el NADT en animales privados de la madre ni en estresados. Los datos hormonales coinciden con la actividad neural del NADT, corroborando el efecto inhibitor del mismo en los niveles de ACTH y Corticosterona en animales sometidos a privación materna o EVI. En conclusión, la ausencia de expresión de receptores GR en el NADT sugiere que no hay una regulación endocrina directa de los glucocorticoides en esa estructura y que ese núcleo manifiesta su efecto inhibitor del eje HHA, en situaciones de estrés físico y emocional, indicado por su actividad neuronal y datos endócrinos.

195. (3629) ALTERACIONES NEUROENDOCRINAS EN LA HIPERTENSION PORTAL EXPERIMENTAL. SCORTICATI, CAMILA; DE LAURENTIIS, ANDREA; PRESTIFILIPPO, JUAN P; FERNÁNDEZ-SOLARI, JAVIER; MOHN, CLAUDIA; PERAZZO, JUAN C; RETTORI, VALERIA

Cátedra de Fisiopatología Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires- Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET)

La hipertensión portal es una de las complicaciones más comunes en la cirrosis hepática humana. En un modelo de estrechez reglada de la vena porta en ratas (HP) hemos demostrado hiperamonemia plasmática y aumento en la captación de NA en núcleos cerebrales. Otros trabajos muestran que el amonio esti-

mula la producción de óxido nítrico (NO) en distintos tejidos. Dado que tanto el NO como las catecolaminas modulan la liberación de LH y PRL de la adenohipófisis (AH), estudiamos el efecto de la HP sobre la liberación de LH y PRL, el contenido de catecolaminas, nNOS, la actividad de la NOS y también se estudió el efecto del amonio (50-100µM) sobre la liberación hormonal en la AH in vitro. Se utilizaron ratas Wistar macho adultas divididas en dos grupos (n=6):Control (C:operación simulada) y HP. Se determinaron los niveles plasmáticos de LH y PRL (RIA) y el contenido de catecolaminas (NA, A y DA) por HPLC, niveles proteicos de nNOS (Western blot) y actividad de NOS (14(2)C-Arginina) en la AH. Encontramos que la HP aumentó LH (ng/ml±SEM) C:0.08±0.02 vs HP:0.20±0.03 (p<0.02) y disminuyó PRL (ng/ml±SEM) C:54.1±4.4 vs HP:39.1 ±3.6(p<0.03) plasmáticas. Hubo un aumento en la actividad de NOS (pmol de NO/AH/min±SEM) C :11.1±0.9 vs HP:14.3±0.6 (p<0.01) y de los niveles proteicos de nNOS (p<0.01) en la AH. También hubo un aumento del contenido de catecolaminas (ng/AH±SEM) NA:C: 37.2±1,8 vsHP: 53.7±5.4 (p<0.05) A:C:4.6±0.1 vsHP:6.8±0.3 p<0.001 y DA:C: 1.2±0.1 vs HP: 1.5±0.3 (ns). El amonio (100 µM) aumentó significativamente la liberación de LH (p<0.05) y disminuyó la de PRL (p<0.02) en la AH in vitro. Estos resultados demuestran que la hipertensión portal produce un aumento adenohipofisario de NA y A, así como de la actividad y contenido de NOS, que modificarían la liberación de LH y PRL. Además, es posible que el amonio tenga una acción directa tanto sobre el lactotrofo como el gonadotrofo.

196. (3633) EFECTO DE PREGNENOLONA (P[4]) Y PROGESTERONA (P[5]) SOBRE LOS RECEPTORES GABA-B EN LA MÉDULA ESPINAL LUMBAR. BAYONA, JULIO; DORFMAN, VERONICA B.; VEGA, M. CRISTINA; COIRINI, HÉCTOR

Lab. de Neurobiología, IBYME-CONICET Dpto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina - UBA

El receptor para GABA tipo B (R GABA-B) ha sido señalado como uno de los receptores involucrados de la modulación del dolor en los sistemas sensoriales aferentes de la región lumbar de la médula espinal. En una presentación previa hemos descrito los cambios producidos por el tratamiento con P[4] y P[5] sobre los receptores µ-opioides (MOR), otro sistema relacionado con la modulación de la analgesia espinal de ratas machos. En el presente estudio se evaluaron los posibles efectos de estos neuroesteroides sobre el R GABA-B. Se utilizaron ratas machos Sprague-Dawley de 45 días de edad (n=5/ grupo), castradas (día 0) y adrenalectomizadas (día 10), que en tres experimentos diferentes, recibieron como tratamiento (día 10-15; inyec. s.c.), Exp1: P[4] (4 mg/kg), Exp2: P[5] (4 mg/kg), Exp3: Trilostano (Tri; 40 mg/kg) o sus respectivos vehículos (C). Usando la técnica de autorradiografía cuantitativa, se determinaron los niveles de R GABA-B en el área correspondiente a las láminas I-II de la región lumbar 6 de la médula espinal, utilizándose Baclofen (20 nM) como ligando y GABA (100µM) para determinar la unión inespecífica. Los tres tratamientos produjeron un aumento en la unión a R GABA-B (P[4]: 122.75±7.46 vs. C: 106.47±11.43, p=0.007 / P[5]: 89.80±13.37 vs. C: 75.45±4.80 p=0.08 / Tri: 95.38±12.96, C: 81.07±7.90, p=0.03). Mostrando que P[4], P[5] y/o alguno de sus derivados modifican a los R GABA-B en la región lumbar de la médula espinal. En función a los resultados obtenidos para R GABA-B y los previamente descritos para MOR que indican una regulación de los neuroesteroides sobre estos receptores espinales, se podría inferir que la acción analgésica de los neuroesteroides involucraría, en parte, una interacción con ambos sistemas (PIP 0819/98- CONICET).

197. (3643) PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO EN EL EFECTO PROTECTOR DEL OMAPATRILAT SOBRE EL COMPORTAMIENTO EN LA RATA AÑOSA NORMAL. LOPEZ-COSTA, JUAN JOSE; PAGLIA, N.; CAPANI, FRANCISCO; COIRINI, HÉCTOR; BASSO, NIDIA

Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. Dr.

Eduardo De Robertis". Inst. Investigaciones Cardiológicas "Prof. Dr. A.C. Taquini. Inst. Biol. y Med. Exp. Fac. Medicina.

Omapatrilat (OM) combina dos efectos: inhibe la enzima de conversión de angiotensina e inhibe la endopeptidasa neutra que degrada el factor natriúretico atrial. El tratamiento crónico de ratas normales jóvenes o añosas con OM mejora las memorias de referencia y de trabajo espacial, la actividad motora y la emocionalidad. El objetivo fue ver si los cambios conductuales están relacionados al incremento de óxido nítrico neuronal. Ratas de 18 meses tratadas con OM desde el destete (n=5) y controles (C; n=5) no tratados se perfundieron con paraformaldehído 4 %. Los cerebros se cortaron con vibrátomo, todos los cortes se procesaron simultáneamente con la técnica de NADPH diaforasa: incubación en solución 0.1 mg/ml de nitroblue tetrazolium y 1 mg/ml de β -NADPH, observación en un microscopio óptico y análisis con NIH-Image. Las neuronas reactivas de la región CA1 mostraron un incremento en el área de los somas en ratas OM (Diferencia media: 0,038, valor de t: 3,546; p=0,0094) el área reactiva y la densidad óptica relativa (DOR) no fueron significativamente diferentes. El área celular de neuronas reactivas de corteza cerebral (CC) no mostró diferencias significativas. Sin embargo, un histograma de frecuencia de distribución de células vs el área de los somas de 160 células/grupo mostró un corrimiento hacia la izquierda en el grupo OM indicando que estas neuronas son más grandes que en los C. Finalmente no se observaron diferencias en la DOR entre grupos. En conclusión, se observó un incremento del área de los somas neuronales de CA1 de hipocampo y de CC NADPH diaforasa reactivos que indicarían un aumento de la producción de NO en el cerebro de ratas tratadas con OM, posiblemente relacionado con su efecto protector sobre el deterioro del comportamiento en la rata añosa normal. (Subsidiado por Laboratorios Bristol Myers Squibb).

198. (3663) ANÁLISIS DE LAS FUNCIONES COGNITIVAS EN PACIENTES CON EPILEPSIA TEMPORAL Y ESCLEROSIS HIPOCAMPAL. ODDO, SILVIA; SOLÍS, PATRICIA; CONSALVO, DAMIÁN; GIAGANTE, BRENDA; SILVA, WALTER; D'ALESSIO, LUCIANA; CENTURION, ESTELA; SAIDÓN, PATRICIA; KOCHEN, SILVIA

Centro de epilepsia. División neurología. Hospital Ramos Mejía. Instituto de biología celular y Neur Instituto de biología celular y neurociencias "Prof. Dr. Eduardo De Robertis". UBA. CEFYBO. CONICET.

El propósito de este trabajo es analizar el estado cognitivo basal en los pacientes con epilepsia temporal y esclerosis hipocampal (EH), determinar su perfil cognitivo y correlacionar los déficit de memoria con la lesión en las imágenes por resonancia magnética (MRI). Seleccionamos 71 pacientes (p.) con epilepsia del lóbulo temporal y esclerosis hipocampal. Todos los pacientes fueron evaluados con un protocolo neuropsicológico que incluye: inteligencia, atención, dominancia manual, memoria verbal, memoria visual, lenguaje y función ejecutiva. Los resultados de los tests fueron normalizados a puntaje Z. Luego fueron agrupados de acuerdo al área cognitiva de interés. Se aplicó el test de chi cuadrado y correlación de Pearson y Spearman. El 66% del total de la población presentó déficit de memoria. El 30% presentó déficit de memoria verbal, de estos pacientes, el 62% (p=0.01) presentó EH izquierda. El 24% presentó déficit de memoria visual, de los cuales el 70.5% (p=0.01) de ellos presentó EH derecha. El 11% presentó déficit bilateral de memoria y el 33% de los p. presentaron una evaluación neuropsicológica normal. La correlación de los déficit de memoria y la lesión en la IRM fue del 66%. El 46% de los p. presentó trastornos del lenguaje y el 25% trastornos en la función ejecutiva. El perfil neuropsicológico de la población estudiada se caracterizó por presentar en su mayoría, déficit de memoria material-específico (verbal/visual), y con menor frecuencia, trastornos del lenguaje y de la función ejecutiva. La correlación con las IRM permitió lateralizar la zona epileptógena en un alto porcentaje de los casos. Se discutirán algunos aspectos relacionados con la plasticidad del sistema ner-

vioso, el lenguaje y la memoria, y su relación con las estructuras mesiales. La información obtenida de la evaluación neuropsicológica resultó relevante para establecer el diagnóstico de la zona epileptógena.

199. (3667) ANÁLISIS GRAFOMÉTRICO DE LA ESCRITURA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON O PARKINSONISMO SECUNDARIO. PEREZ-LLORET, SANTIAGO; BRADLEY, JULIO; NOUZEILLES, MARÍA INES; MERELLO, MARCELO

Sección de Movimientos Anormales, Dep. de Neurología, Instituto de Inv. Neurológicas Raul Carrea

La micrografía es la alteración de la escritura más comúnmente hallada en pacientes con Enfermedad de Parkinson (EP). Si bien en el Parkinsonismo Secundario (PS) se ha hallado una disminución de la velocidad y amplitud del trazo, no está claro si estas alteraciones difieren a las halladas en la EP. El objetivo del presente trabajo fue relacionar las características de la escritura en la EP con la gravedad de la enfermedad, el efecto de la medicación antiparkinsoniana y diferenciarlas de las alteraciones encontradas en el PS. Para esto, 46 muestras de escritura fueron analizadas por un grafólogo profesional y se estableció la presencia o ausencia de 15 características grafométricas. 36 pacientes con EP y 10 con PS fueron instruidos para que copiaran una oración y dibujaran círculos y cajas en una hoja. En relación a la EP, se observó que: 1) en aquellos pac. con valores altos de UPDRS y H&Y la incidencia de micrografía era mayor (p=0.03 para ambos, Mann-Whitney); 2) los pacientes con fluctuaciones motoras tuvieron mayor incidencia de micrografía y cambio de dirección del trazo (ambos p=0.02, Fisher); 3) no se hallaron diferencias entre los pac. evaluados en ON u OFF. La línea de base de la escritura no ubicada sobre el renglón y yendo más allá de este, fueron hallados más frecuente en pacientes con PS vs. EP (p=0.02 y p=0.01 respectivamente, Fisher). Estos resultados sugieren que las características de la escritura en pacientes con EP varían de acuerdo a la gravedad de la enfermedad, dependiendo, la presencia de micrografía, tanto de alteraciones relacionadas a la dopamina como no relacionadas con esta. La línea de base de la escritura no ubicada sobre el renglón y yendo más allá de este, fueron los únicos parámetros que podrían sugerir síntomas parkinsonianos por PS.

200. (3749) RITMO CIRCADIANO Y MELATONINA EN EL DESPRENDIMIENTO EXPERIMENTAL DE RETINA. IRIBARNE, MARÍA; TORBIDONI, VANESA; OGAWA, LILIANA; CANTÓ SOLER, VALERIA; SUBURO, ANGELA M.

Universidad Austral

El éxito de la reaplicación quirúrgica de una retina desprendida requiere la preservación de la retina neural (RN) y del epitelio pigmentario (EP). A fin de investigar factores capaces de mejorar la sobrevivencia de estos tejidos, estudiamos el efecto de la adaptación a la oscuridad, el momento del día y la administración de melatonina, sobre la lesión del EP producida por el desprendimiento experimental de la retina. Se utilizaron ratones BALB-C sometidos a distintos regímenes de luz-oscuridad o tratados con distintas dosis de melatonina (50 μ g - 5 mg/kg s.c.). El desprendimiento se realizó en ojos enucleados bajo luz roja. La lesión del EP fue estudiada mediante exclusión de colorante (rojo de propidio), inmunotinción para la proteína ZO de las uniones estrechas y microscopía electrónica de barrido. Se obtuvo preservación óptima del EP en los desprendimientos efectuados durante la ventana 20.00-22.00 horas, en animales adaptados a la oscuridad durante un mínimo de 48 horas. En animales sometidos a un ciclo de iluminación invertido, la preservación óptima también se obtuvo al comienzo de la noche subjetiva. La administración de muy bajas dosis de melatonina (50 μ g/kg) permitió obtener un EP sin evidencias de lesión en cualquier momento del día con apenas una hora de adaptación a la oscuridad. La sobrevivencia de las células EP después del desprendimiento experimental depende tanto de las condiciones previas de iluminación,

como del momento del ciclo circadiano cuando ocurre el desprendimiento. Además, las condiciones necesarias para impedir la lesión del EP durante el desprendimiento pueden ser obtenidas mediante la administración de melatonina. Se considera que estas observaciones podrían ser útiles para comprender las causas de los desprendimientos espontáneos así como para la planificación de las cirugías vitreoretinales que requieren un desprendimiento programado.

201. (3761) PROGESTERONA: PAPEL NEUROPROTECTOR EN DIFERENTES ESTADIOS EVOLUTIVOS DE LA NEURODEGENERACION. GARAY, LAURA; GONZALEZ DENISELLE, MARIA CLAUDIA; LIMA, ANALIA; LOPEZ COSTA, JUAN JOSE; DE NICOLA, ALEJANDRO F.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Dto de Bioquímica Humana, Fac Med, UBA. Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis", Facultad de Medicina, UBA

Los ratones Wobbler (Wr) son buenos modelos experimentales de enfermedad de motoneurona. Estos animales presentan degeneración de motoneuronas espinales y astrocitosis. A nivel clínico, se visualizan signos de debilidad muscular al mes de vida. La PROG, esteroide neuroprotector, revierte anomalías morfológicas, bioquímicas y funcionales de la neurodegeneración. El objetivo de este trabajo fue dilucidar si PROG tiene acción antioxidante en un determinado estadio de la enfermedad. Se determinó la actividad de NADPH-diaforasa (NADPH-d) como parámetro de estrés oxidativo, tanto en motoneuronas como astrocitos de médula espinal. Se utilizaron ratones controles (CTL 2m) y Wr de 2 meses (Wr 2m) y 4 meses de edad (CTL 4m, Wr 4m). Los animales permanecieron sin tratamiento o recibieron un pellet de 20 mg de PROG x 18 días. Se corroboró: hiperactividad significativa de NADPH-d en motoneuronas de Wr 2m (31.16 ± 3.47 neuronas/área) en relación a CTL 2m (3.49 ± 0.84 ; $p < 0.001$), y en relación a Wr 4m (Wr 4m: 8.70 ± 1.37 ; vs. Wr 2m $p < 0.001$). La PROG administrada a Wr 2m redujo a la mitad el número de neuronas NADPH-d positivas de Wr 2m (Wr+PROG 2m: 13.56 ± 3.66 vs. Wr2m; $p < 0.01$); mientras que no produjo efecto en Wr 4m. Un efecto similar se observó en astrocitos positivos para NADPH-d. Morfológicamente, las motoneuronas de Wr mostraron vacuolización citoplasmática, perfil indicativo de muerte celular tipo II. Los Wr 2m+PROG presentaron disminución significativa del porcentaje de células vacuoladas / área (Wr 2m: 7.3 ± 1.7 vs. Wr 2m + PROG: 1.49 ± 0.4 , $p < 0.05$). PROG no fue efectiva en Wr 4m. Conclusión: La PROG previene la degeneración vacuolar y neurotoxicidad por NO en estadios iniciales de la neurodegeneración, apoyando su rol protector en enfermedades neurodegenerativas.

202. (3785) DÉFICIT EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA RELACIONADA CON CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA NEURAL (nNOS) BASAL Y ESTIMULADA POR CARBACOL EN HIPOCAMPO DE RATONES SOMETIDOS A ESTRÉS CRÓNICO. PALUMBO, MARÍA LAURA; SILBERMAN, DAFNE MAGALÍ; ZORRILLA-ZUBILETE, MARÍA; CREMASCHI, GRACIELA; GUELMAN, LAURA; GENARO, ANA MARÍA

CEFAYBO-CONICET. 1ª Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA

El sistema colinérgico en el cerebro de mamíferos está altamente involucrado en funciones cognitivas. La activación de los receptores muscarínicos conduce diferentes vías de señalización intracelular dependiendo del subtipo de receptor y del tejido en estudio. Entre estas se encuentra la activación de la NOS neural (nNOS) con la subsecuente liberación de NO. El NO es un importante regulador de la función neural siendo neuroprotector a bajos niveles y neurotóxico a altas concentraciones. Por otra parte el estrés crónico ha sido sugerido como un importante factor predisponente para comportamientos relacionados con déficit en

la función cognitiva. El objetivo del presente trabajo fue analizar en ratones BALB/c sometidos a un modelo de estrés crónico moderado la capacidad de aprendizaje y memoria en respuesta a la evitación condicionada por shock eléctrico plantal. Además, se evaluó en otro grupo de ratones no utilizados para el estudio conductual, su correlación con la activación colinérgica de nNOS en hipocampo (estructura relacionada con la función cognitiva). Pudo observarse que los ratones estresados (E) presentaron una menor eficiencia en la retención que los controles (N) ($X \pm ES$, N, latencia (seg) de entrada a la hora de aplicado el shock, $N=438 \pm 68$, $E=105 \pm 44$, $n=20$). La actividad basal de NOS dependiente de calcio fue significativamente menor en E (pmoles/g/min, $N=350 \pm 28$, $E=124 \pm 19$, $n=6$) que se correlacionó con una menor expresión de nNOS por Western-blot. La estimulación con carbacol (agonista colinérgico) mostró un corrimiento de la curva hacia mayores concentraciones del agonista para E ($p < 0.05$, $n=6$). Se concluye que el estrés crónico reduce la actividad de la nNOS estimulada por la activación colinérgica y como consecuencia de ello existiría un déficit de retención cognitiva.

203. (3829) MODULACION TEMPRANA MEDIADA POR ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO Y DEL NITROGENO SOBRE LA APOPTOSIS RADIOINDUCIDA EN EL SNC EN DESARROLLO. ROBELLO, ELIZABETH; DUBNER, DIANA; PÉREZ, MARÍA DEL ROSARIO; MICHELIN, SEVERINO; PUNTARULLO, SUSANA; GISONE, PABLO

Autoridad Regulatoria Nuclear Autoridad Regulatoria Nuclear - Facultad de Farmacia y Bioquímica

El sistema nervioso central en desarrollo -SNCD- es exquisitamente sensible a la radiación ionizante. Las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno -ERO/ERN- intervienen en procesos de amplificación a partir de los eventos iniciantes siendo la apoptosis la forma característica de la muerte radioinducida en el SNCD. Estudiamos la producción de ERO/ERN en cultivos de precursores neuronales irradiados in vitro y el rol de dichas especies en la modulación de la apoptosis. Los cultivos fueron irradiados con una dosis -Gamma- de 2 Gy. La generación de óxido nítrico -NO- fue estimada a través de nitratos y nitritos -NO₃ + NO₂- en el medio de cultivo. ERO/ERN fueron determinados por quimioluminiscencia dependiente de Luminol -QL- y el análisis de apoptosis se realizó con IP sobre la población sub-G1 a través de citometría de flujo. Expresando los resultados como irradiados vs controles los mismos son los siguientes: la apoptosis se hizo significativa a partir de las 4 hs pi alcanzando un máximo a las 24 hs pi - 36% vs 6%. El contenido de NO₂ fue significativo a partir de los 30' postirradiación -pi- 0,12 vs 0,04 $\mu\text{mol/mg prot-}$ con un máximo a los 360' pi -0,43 vs 0,08 $\mu\text{mol/mg prot-}$. La QL mostró una disminución significativa entre 30' y 60' pi -1,18 vs 2,55 UA- y un incremento significativo a los 360' -4,48 vs 1,10 UA. L-NAME -0,5 mM- incrementó la apoptosis a las 24 hs -43%- y generó un aumento en la QL del 167% a los 60' y un descenso del 45% desde los 240'. El inhibidor de caspasa-3 zDEVD-fmk -20 μM - disminuyó la QL en un 54 % revirtiendo la apoptosis. Concluimos que el NO tiene un efecto neuroprotector temprano con un comportamiento bifásico de ERO/ERN y que el incremento tardío de los mismos es caspasa dependiente.

204. (3836) ESTUDIO COMPARATIVO DE CATECOLAMINAS PLASMÁTICAS EN DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS. DE LAURENTIIS, ANDREA; MOHN, CLAUDIA; SCORTICATI, CAMILA; VISSIO, PAULA; PRESTIFILIPPO, JUAN; SEILICOVICH, ADRIANA; RETTORI, VALERIA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. CEFAYBO-CONICET. Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA

Diversos tipos de estrés evocan en el organismo respuestas neuroendocrinas. Tanto las catecolaminas como los glucocorticoides son fundamentales para la recuperación de la homeostasis alterada por el estrés. Por lo cual en el presente trabajo se estudiaron en forma comparativa los niveles plasmáticos de

catecolaminas en el estrés neurogénico agudo (inmovilización, 2h, EN), neurogénico crónico (inmovilización/2h/2 veces al día/5d, ENR) y endotóxico agudo (LPS, i.p., 5mg/kg, 3h) en ratas Sprague Dawley macho adultas. Niveles plasmáticos de noradrenalina (NA), adrenalina (A) y dopamina (DA) fueron determinados por HPLC (ng/ml±SEM). Dado que el LPS interacciona con células corticales de la glándula adrenal (GA) también estudiamos la presencia de receptores para la endotoxina (CD14 y Toll-like 4) en dicho tejido. En todos los modelos de estrés estudiados se observó un aumento significativo de la actividad catecolaminérgica. En el EN fueron importantes los aumentos de NA (C:2.76±0.18, EN:9.68±0.41) y A (C:8.89±0.83, EN:17.15±1.38), p<0.001, y en el ENR estos aumentos significativos fueron más leves, NA (C:2.76±0.18, ENR:7.40±0.74) y A (C:4.27±0.23, ENR:6.21±0.39), p<0.05. Mientras que el LPS aumentó marcadamente los niveles de DA (C:0.19±0.03, LPS:0.38±0.07, p<0.001) siendo leve el aumento significativo de NA y A (p<0.05). Además la administración de LPS incrementó la inmunomarcación del CD14 y el Toll-like 4 en la GA. Cuando fueron incubadas in vitro GA provenientes de ratas sometidas a ENR se observó una disminución significativa de la liberación de A (C:620.7±17.7, ENR:58.11±4.60), p<0.0001. Estos resultados muestran que en los tipos de estrés estudiados hay un incremento de las catecolaminas plasmáticas que varía tanto en intensidad como en predominio de alguna de ellas. Es mayor la respuesta al estrés agudo que al crónico, más aún parecería que en este último, el leve aumento de A no sería proveniente de la GA sino probablemente de los nervios periféricos.

205. (3923) LEUCOENCEFALOPATIA POSTERIOR REVERSIBLE (LPR) EN ECLAMPSIA Y HELLP. PRESENTACION DE CASOS. PATRUCCO, LILIANA; VALIENSI, S.M.; VIDELA, C.G.; BAUSO, D.; ZABALA MENDEZ, R.F.; CRISTIANO, E.; BAUSO TOSELLI, P.L.

Servicio de Neurología del Hospital Italiano

La LPR, se manifiesta con cefalea, alteraciones de las funciones mentales, convulsiones y trastornos visuales, asociándose a entidades como encefalopatía hipertensiva, eclampsia, inmunosupresores, etc. Las imágenes revelan afeción de sustancia blanca parietooccipital predominantemente. OBJETIVO: Reportar 3 casos de LPR asociados a eclampsia y HELLP (hemólisis, elevación de enzimas hepáticas, plaquetopenia). CASO 1: Primigesta de 39 años, embarazo controlado de 31 semanas. Cesárea por TA 220/110 mmHg, náuseas, vómitos, encefalopatía. Post cesárea: cuadriparesia, estupor y HELLP. RMI: hiperintensidad en protuberancia, mesencéfalo y ambos tálamos. Recuperación total: 3 meses. CASO 2: Primigesta de 26 años, embarazo controlado de 38 semanas. Post parto: TA 190/120mmHg, cefalea, vértigo, visión borrosa, convulsión tónico-clónica generalizada y HELLP. A las 24 hs. déficit motor en hemisferio derecho. RMI: hiperintensidad bifrontal y parietal derecha. Recuperación total: 3 meses. CASO 3: Primigesta de 31 años, embarazo controlado de 26 semanas. Cesárea por convulsiones tónico-clónicas generalizadas y T.A.170/100 mmHg. Postcesárea: coma, signos de descerebración y HELLP. RMI: hiperintensidad en tronco cerebral, parietooccipital bilateral, ganglios basales. Recuperación neurológica: 72 hs. Las hipótesis sobre la asociación entre LPR y eclampsia-HELLP son: 1. Alteración en la reactividad vascular (mayor sensibilidad a agentes presores, deficiencia de prostaglandinas y disfunción endotelial) 2. Disrupción aguda de la barrera hematoencefálica (BHE), por elevación brusca de la TA. 3. Presencia de neurotoxinas que afectarían la BHE. 4. Combinación de las 3.

ONCOLOGÍA III

206. (3621) RESPUESTA DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO TRANSFECTADAS CON QUIMERINA β2 A COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

LORENZANO MENNA, PABLO; PECHE, LETICIA; KAZANIETZ *, MARCELO; ALONSO, DANIEL; GOMEZ, DANIEL

*Universidad Nacional de Quilmes * Centro de Terapias Experimentales, Escuela de Medicina de la Universidad de Pennsylvania.*

Las quimerinas son capaces de inactivar a Rac1, una proteína de señalización de la superfamilia Ras que interviene en la transformación maligna y en procesos de migración tumoral. Anteriormente demostramos que la sobreexpresión de quimerina reduce dramáticamente la agresividad del carcinoma mamario murino F3II. En este trabajo analizamos in vitro la respuesta a componentes de la matriz extracelular de células F3II transfectadas de manera estable con el dominio activador de GTPasa de quimerina β2 (línea GB1) respecto de la línea F3II control. Los niveles de Rac se estudiaron por Western blot y la metaloproteasa 9 (MMP-9) se cuantificó mediante zimografía seguida de densitometría. La exposición de cultivos de GB1 al factor de crecimiento epidérmico incrementó la secreción de MMP-9 asociada a un aumento de Rac activo (Rac-GTP), pero no tuvo efecto sobre células F3II. El agregado de fibronectina soluble aumentó más de 10 veces la actividad proteolítica de ambas líneas. Por el contrario, el colágeno IV sólo indujo la secreción de MMP-9 al actuar sobre las células transfectadas con quimerina β2 (GB1 control: 11.4±4.3 U.D. vs. GB1 colágeno: 55.6±9.0 U.D.; p<0.01). Asociado a este efecto, se verificó un aumento en los niveles de Rac activo en respuesta a colágeno IV. El contacto con cubiertas de colágeno IV y fibronectina en ausencia de suero produjo la reorganización del citoesqueleto de actina y extensión sobre el sustrato en células GB1, no provocando respuesta en los controles F3II. La reducción de los niveles de Rac activo debido a la reexpresión de quimerina causaría una disminución en los niveles constitutivos de señalización celular en células de carcinoma mamario, permitiendo una mayor sensibilidad a señales externas de la matriz extracelular

207. (3685) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE RECEPTORES HORMONALES EN TUMORES MAMARIOS EN RATAS HIPOPROLACTINEMICAS VÍRGENES, MADRES O IMPLANTADAS CON ESTRADIOL EN NÚCLEO ARCUATO. JAHN, GRACIELA; EZQUER, MARCELO; CARON, RUBEN W; DEIS, RICARDO P.

Laboratorio de Reproduccion y Lactancia, IMBECU CONICET

El cáncer mamario en la rata es controlado por hormonas ováricas y lactogénicas y la gestación es un factor protector. Estudiamos en un modelo de rata hipoprolactinémica (OFA-hr/hr) la incidencia y progresión de tumores (T) mamarios inducidos por DMBA (15 mg/rata p.o.) y el efecto del desarrollo mamario inducido por gestación y lactancia (G+L) o por implante de estradiol (I) en el núcleo arcuato (que produce hiperprolactinemia). Administración de DMBA a ratas vírgenes (V) de 55 o de 80 días de edad produjo Ts en el 71% y 17% respectivamente. El desarrollo mamario producido por G+L o por I no modificó la incidencia, pero en las G+L el tumor regresó totalmente en un 40% de las ratas y un 23% presentó T con múltiples zonas de necrosis. Para determinar la influencia de los receptores de estrógeno a y b (ERa, ERb), de PRL largo (RPRL) y de progesterona (RPg) en la aparición, desarrollo e involución de los Ts en estos tres modelos, estudiamos por medio de RT-PCR semicuantitativo su expresión (DO relativa a actina) en glándulas mamarias y los Ts respectivos de ratas que habían (T) o no (NT) desarrollado T. En los Ts los RPg fueron más altos en las I (1.05±0.08) que en V 0.68±0.06 y G+L:0.73±0.06. En GMs, el ERa aumentó en las VT (0.74±0.06) y G+LT (0.79±0.06) comparado con las respectivos NT (0.38±0.14 y 0.52±0.09), mientras que se observó lo opuesto en las I (INT: 0.91±0.1 IT: 0.19±0.06). En los ERb el patrón fue similar. El RPRL fue más alto en las VT y G+LT comparadas con las NT pero no hubo diferencias entre INT e IT. Los aumentos en REgs y PRL

en GMs podrían ser determinantes en la aparición de T en las ratas V y G+L. La diferencia en el patrón de expresión entre las G+L y las I podría estar relacionada con la involución tumoral observada únicamente en G+L.

208. (3688) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y APOPTÓTICOS EN TUMORES MAMARIOS EN RATAS HIPOPROLACTINÉMICAS VÍRGENES, MADRES O IMPLANTADAS CON ESTRADIOL EN NÚCLEO ARCUATO. EZQUER, MARCELO; CARON, RUBEN W; DEIS, RICARDO P.; JAHN, GRACIELA A.

Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU CONICET

El 63% de los tumores (T) mamarios inducidos por DMBA en ratas hipoprolactinémicas OFA-hr/hr que tuvieron una gestación y lactancia (G+L) regresan o tienen puntos de necrosis, mientras que los inducidos en vírgenes (V) o implantadas con estradiol en el núcleo arcuato (I, que produce desarrollo mamario similar a la gestación) no lo hacen. Para profundizar el estudio de las diferencias en la evolución en estos modelos, evaluamos por medio de RT-PCR semicuantitativa (DO relativa a actina) la expresión de factores involucrados en el crecimiento e involución del tejido mamario normal o tumoral. Las glándulas mamarias (GM) de ratas con T del grupo G+L tuvieron mayor expresión de IGF-1 (0.9 ± 0.08), comparado con las GMs que no desarrollaron T (NT: 0.64 ± 0.08); en el grupo I la relación fue inversa (IT: 0.31 ± 0.08 INT 0.65 ± 0.11). IGF-BP3 mostró un comportamiento similar. Bax fue mayor en GMs de las VT (0.44 ± 0.09) y G LT (0.47 ± 0.07) que en VNT (0.03 ± 0.01) y G+LNT (0.13 ± 0.03) y menor en IT (0.05 ± 0.01) que en INT (0.25 ± 0.05). SGP-2 (relacionado con involución de GM) fue similar en todos los grupos (ej. VNT 0.64 ± 0.08) excepto en INT: 0.2 ± 0.05 e IT: 0.21 ± 0.06 . En tejido tumoral, IGF I fue menor en I (0.22 ± 0.07) que en V (0.41 ± 0.04) o G+L (0.53 ± 0.06). IGF-BP3 fue mayor en G+L (0.83 ± 0.07) que en V (0.47 ± 0.07) o I (0.56 ± 0.06); SGP-2 mostró un patrón similar (V 0.65 ± 0.09 , G+L 0.96 ± 0.11 , I 0.27 ± 0.04) y bcl-2 un patrón inverso (V 0.81 ± 0.1 , G+L 0.5 ± 0.09 , I 0.91 ± 0.05). La expresión diferencial de IGF1, BP-3 y SGP-2 observada en los tumores de las ratas G+L se corresponde con la involución del T observada en este grupo. Las diferencias encontradas en el tejido mamario no tumoral estarían más relacionadas con el grado de desarrollo mamario que con la evolución tumoral.

209. (3750) DIFERENCIA ANTIGÉNICA ENTRE TUMORES PRIMARIOS Y SUS CÉLULAS METASTÁSICAS EN MÉDULA ÓSEA: RELACIÓN CON LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ANTI MUCINA 1 (MUC1) EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA. CROCE, VIRGINIA; ISLA-LARRAIN, MARINA; TUR, ROBERTO; COLUSSI, ANDREA; RABASSA, MARTÍN; SEGAL-EIRAS, AMADA

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas Servicio de Hematología, Hospital Interzonal de Agudos Gral. San Martín, La Plata, Argentina.

Objetivos: Describir el patrón de expresión de epitopes peptídicos y carbohidratos asociados a MUC1 en células malignas aisladas de médula ósea en relación a las características histopatológicas del tumor primario y la respuesta inmune humoral anti-MUC1. Materiales: tumor primario, suero y aspirado de médula ósea de 17 pacientes con carcinoma de mama invasor. Métodos: inmunohistoquímica estándar con anticuerpos monoclonales (AcMo): anti-carbohidratos, Lewis x (KM380); sLewis x (KM93); Lewis y (C14) y Tn (DAKO); anti-peptido de MUC1: C595, HMF2 y SM3; anti-citoqueratinas (DAKO); anti-protooncogenes erbB2 y erbB3 (SIGMA) y AcMo anti CD34 y anti CD45; detección de MUC1 circulante y anticuerpos anti-MUC1 libres y acoplados mediante ELISA; aislamiento de células malignas de médula ósea mediante esferas inmunomagnéticas y obtención de células malignas para cultivo primario con centrifugación en gradiente de Ficoll Hypaque. Resultados: en los tumores primarios, el 76% de las

muestras fue positiva para MUC1, 29,5% para Tn, 59% para Lewis x, 12% sLewis x y 6% Lewis y en tanto que erbB2 fue positivo en el 11% y erbB3 en ningún caso; las células aisladas de médula ósea expresaron MUC1, altos niveles de Lewis x, sLewis x y Tn, mientras que fue escasa la expresión de Lewis y. MUC1 libre se halló elevada en dos casos y sólo en un paciente se hallaron complejos inmunes elevados. 1. Se demostró que la expresión de antígenos carbohidratos está incrementada en células neoplásicas aisladas de médula ósea respecto de los tumores originales. 2. No se demostró una respuesta inmune humoral anti-MUC1. 3. La metodología empleada permitió la inmortalización selectiva de células cancerosas metastásicas dado que se establecieron líneas celulares en cultivo corto plazo.

210. (3767) EFECTO IN VITRO DEL INTERFERÓN ALFA-2B (IFN) SOBRE HEPATOCITOS PRENEOPLÁSICOS. ROL DEL TGF β 1. ALVAREZ, MARÍA DE LUJÁN; RONCO, MARÍA TERESA; OCHOA, ELENA; MONTI, JUAN; CARNOVALE, CRISTINA; PARODY, JUAN PABLO; CARRILLO, MARÍA CRISTINA

Instituto de Fisiología Experimental (CONICET), Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas (U.N.R.)

El tratamiento con IFN en ratas con preneoplasia hepática aumenta la apoptosis de los focos preneoplásicos, reduciendo el número y el tamaño de los mismos. Se encontraron además, en estos animales, aumentos significativos de los niveles séricos de TGF β 1 y del número de hepatocitos con inmunotinción TGF β 1-positiva. Con el propósito de evaluar si el efecto apoptótico del IFN está mediado por el TGF β 1 hepatocitario, se trabajó con animales sometidos a un modelo biestadio de carcinogénesis experimental (iniciación-promoción). Se usaron dos grupos: animales iniciados-promovidos (IP) e iniciados solamente (I). Se obtuvieron hepatocitos aislados los cuales fueron cultivados: a) en ausencia de IFN, b) estimulados con IFN y c) en presencia de IFN + anticuerpo anti-TGF β 1. Se observó un aumento significativo de la translocación nuclear de Smad 2/3 (mediadores de señalización intracelulares del TGF β 1) en los grupos estimulados con IFN, indicando activación de la vía del TGF β 1 (I= $23,0 \pm 0,3\%$, IP= $58 \pm 2\%$, $p < 0,05$). Este incremento fue revertido en un 100% cuando se adicionó al medio de cultivo anti-TGF β 1. La determinación de apoptosis por microscopía de fluorescencia utilizando tinción con naranja de acridina mostró que el estímulo con IFN aumenta significativamente el porcentaje de células apoptóticas. Dichos porcentajes volvieron a los encontrados en ausencia de IFN cuando los hepatocitos se cultivaron con IFN+anti-TGF β 1 (I: sin IFN= $7,7 \pm 0,5\%$; con IFN= $14,1 \pm 0,3\%*$; con IFN+anti TGF β 1= $7,2 \pm 0,5\%$; IP: sin IFN= $8,5 \pm 0,6\%$; con IFN= $16,2 \pm 0,4\%*$; con IFN+anti TGF β 1= $8,2 \pm 0,5\%$; $*p < 0,05$). En conclusión, el IFN induce in vitro apoptosis en los hepatocitos de hígados preneoplásicos y dicho efecto está mediado por el TGF β 1 producido por los propios hepatocitos.

211. (3947) EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNFA) INDUCE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR INHIBIDOR DE LEUCEMIAS (LIF) EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS. SCHERE LEVY, CAROLINA; QUAGLINO, ANA; BLAUSTEIN, MATÍAS; PELISCH, FEDERICO; CAMERANO, GABRIELA; DRAN, GRACIELA; SREBROW, ANABELLA; KORDON, EDITH

ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA.

Hemos demostrado que el Factor Inhibidor de Leucemias (LIF) se expresa en la glándula mamaria normal durante la etapa temprana de la involución post-lactancia, en tumores mamarios murinos y en líneas celulares mamarias neoplásicas y no neoplásicas. Mediante estudios in vivo reportados anteriormente, hemos demostrado que la expresión de este factor en la mama normal está regulada por factores secretados localmente y no por

hormonas circulantes en el torrente sanguíneo. Dado que en la literatura se ha reportado que el TNFalfa es capaz de inducir la expresión del LIF en distintos tipos celulares, nuestro objetivo fue determinar si este factor podía estar involucrado en la inducción de la expresión de LIF en los distintos sistemas descriptos. En primer lugar, por RT-PCR y por ensayos de viabilidad de células L929, hallamos que los tumores de mama inducidos por MMTV expresan TNFalfa ?in vivo y en cultivo. Al analizar por RT-PCR semicuantitativa la expresión de TNFalfa en mama normal de ratón, hallamos que la misma es prácticamente indetectable durante la lactancia pero aumenta a las 24hs de suspenderse el amamantamiento, conservándose los altos niveles de expresión durante los 3 primeros días de involución. Este patrón de expresión es muy similar al ya reportado para LIF en la mama normal. Finalmente, el tratamiento de células mamarias no transformadas como HC11 o SCp2 con TNFalfa indujo un aumento significativo en la expresión del LIF. El TNFalfa induce expresión de LIF en epitelio mamario y podría estar cumpliendo esta función in vivo tanto en mama normal como neoplásica.

212. (3949) ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR INHIBIDOR DE LEUCEMIAS (LIF) CON LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT3 EN EPITELIO MAMARIO NORMAL Y NEOPLÁSICO. QUAGLINO, ANA; SCHERE LEVY, CAROLINA; MEISS, ROBERTO; KORDON, EDITH

ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, IHEMA, e Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

Hemos demostrado anteriormente la presencia del factor inhibidor de leucemias (LIF) en mamas involucionando, tumores mamarios y en cultivo de células neoplásicas y no-neoplásicas. El objeto del presente estudio fue determinar si tanto in vivo como in vitro la expresión de LIF está asociada a la activación del factor de transcripción Stat3. Hemos hallado que en la mama normal de hembras amamantando, el tratamiento con pellets conteniendo LIF induce la activación de Stat3 que pudo visualizarse por inmunohistoquímica tanto por el uso de anticuerpos específicos para P-Stat3 como por su translocación núcleo de las células epiteliales. Similar marcación nuclear fue hallada en tumores mamarios murinos inducidos por MMTV. Esta activación fue confirmada por análisis de Western blot utilizando anticuerpos específicos para la forma activada de Stat3. En cultivos primarios de tumores de mama en los cuales se había detectado una alta expresión de LIF también se halló Stat3 activado. Sin embargo en la línea celular M3 que presenta altos niveles de expresión de LIF pero su receptor no se expresa, hallamos que los niveles de activación de Stat3 son significativamente más bajos que en los otros sistemas. Finalmente, el tratamiento con LIF de células mamarias no neoplásicas HC11 induce un notable aumento en la activación de este factor de transcripción. Nuestros resultados sugieren que el LIF es al menos parcialmente responsable de la activación de Stat3 en epitelio mamario normal y neoplásico.

213. (3952) LA INHIBICIÓN DE UNA ESPECIE DE RNA MENSAJERO QUE CODIFICA PARA LA BETA 1-INTEGRINA SE ASOCIA AL FENOTIPO TUMORAL MAMARIO. GATTELLI, ALBANA; CASTILLA, LUCIO; KORDON, EDITH

ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, IHEMA, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Program of Gene expression, UMASS School of Medicine, Massachusetts, USA.

Hemos reportado previamente que la progresión de tumores preñez-dependiente inducidos por MMTV(LA) a un comportamiento preñez-independiente, se asocia a la aparición de nuevas inserciones virales. En particular mostramos que la progresión de la línea D2 se producía por la selección de células conteniendo una inserción de MMTV en el último intrón de la Beta1-integrina que corresponde a la región intracitoplasmática de la proteína.

Además hallamos que la dirección de transcripción del gen era opuesta a la dirección de transcripción viral. Con el objeto de determinar el efecto de esta inserción en la expresión de la Beta1-integrina a nivel de proteínas, se llevaron a cabo estudios de Western blot con anticuerpos que reconocen la región extracelular de la proteína. Por otro lado, para analizar todas las especies de RNAm que se generan a partir del gen mutado se realizaron ensayos de 5'RACE-PCR. En el primer caso no hallamos diferencias significativas en el nivel de expresión de la proteína de Beta1-integrina. En cambio, a partir de RNA de tumores y mama normal de hembras vírgenes y amamantando hallamos al menos dos especies de RNAm que corresponderían a variantes por splicing alternativo del gen en cuestión. En particular encontramos que una de las especies de RNAm estaba regulada diferencialmente cuando se compararon tumores preñez-independientes con mamas de hembras vírgenes. El nivel de expresión de esta especie era menor en el tejido neoplásico. Esta banda fue clonada y secuenciada, y así se confirmó que la misma correspondía a una especie Beta1-integrina. Estos resultados sugieren que la inhibición de la expresión de formas específicas de la Beta1-integrina podrían estar asociadas a la progresión de tumores mamarios murinos.

214. (3954) LA PCR INVERSA (IPCR) PERMITE LA IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA TUMORIGÉNESIS MAMARIA. GATTELLI, ALBANA; ZIMBERLIN, MARÍA NOEL; CIRIO, MARÍA CECILIA; MARTÍNEZ, NATALIA; CASTILLA, LUCIO; KORDON, EDITH

ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, IHEMA, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires Program of Gene expression, UMASS School of Medicine, Massachusetts, USA.

El virus del tumor mamario del ratón (MMTV) induce tumores mamarios por mutagénesis insercional. Se sabe que la secuencia viral puede alterar positiva o negativamente la expresión de genes de la célula huésped. En un modelo de tumorigénesis inducida por la variante MMTV(LA) estamos determinando secuencias genómicas alteradas por el cDNA viral con el objeto de hallar factores asociados a la iniciación y progresión tumoral mamaria. Por medio de la técnica de PCR invertida (IPCR) hemos clonado y secuenciado sitios de inserción viral en 8 líneas tumorales distintas. En 4 de ellas encontramos inserciones en el locus Int2/FGF3. No hallamos inserciones en ningún otro de los loci "int" ya descriptos. Hallamos además inserciones de MMTV dentro de, o en las proximidades de, otros 5 genes: 1) Ca8 (Carbonic anhydrase 8): se asocia a la sobre-expresión de VEGF en neoplasias; 2) Rai2 (retinoid acid-induced protein 2) el ácido retinoico está involucrado en diferenciación celular e inhibe el crecimiento asociado con la inhibición de la ciclina D1 y puede inhibir apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama; 3) Bmpr2 (bone morphogenetic protein receptor type 2): la sobreexpresión del dominante negativo de esta proteína inhibe el crecimiento de células tumorales mamarias humanas; 4) Rab2: pertenece a la familia de ras y es una proteína que une GTP; 5) β 1-Integrina: su mal funcionamiento está asociado a invasividad tumoral y a la pérdida de adhesión celular. Además hallamos 2 inserciones en genes nuevos a los cuales no se les conoce su función. La técnica de IPCR es una herramienta útil para la búsqueda de genes cuya expresión alterada pueda estar involucrada en la tumorigénesis mamaria.

215. (3958) LA MORFOLOGÍA DE TUMORES INDUCIDOS POR EL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO (MMTV) INDICA ACTIVACIÓN DE LA CASCADA DE SEÑALES WNT. MEISS, ROBERTO; CIRIO, MARÍA CECILIA; GATTELLI, ALBANA; BINAGHI, MARÍA; KORDON, EDITH

Instituto de Estudios Oncológicos, ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

En ratones transgénicos se ha hallado que la morfología de los tumores mamarios que en ellos aparecen está asociada a la cascada de señales en la que participa el gen sobre-expresado. Es así que fue posible agrupar estos tumores en dos grandes grupos: aquellos en los cuales está activada la cascada Erb/Ras y aquellos en los que está activada la cascada Wnt. Este grupo incluye tumores que sobre-expresan CK2 alfa y Fgf. Con el objeto de determinar si este tipo de análisis podía ser también llevado a cabo en tumores surgidos en animales no transgénicos se analizaron los correspondientes parámetros morfológicos en 59 pasajes de 18 tumores primarios surgidos en hembras infectadas con el virus del tumor mamario murino (MMTV). Este análisis demostró que las características morfológicas de 58 de los 59 tumores analizados corresponden a aquellos tumores transgénicos que presentan la cascada Wnt activada. Las características que permiten tal definición son: la diferenciación glandular y ocasionalmente mioepitelial, presencia de secreción y de estroma fibroso y la frecuente queratinización que fue avalada por la marcación positiva con anticuerpos anti citoqueratina 1 (K1). Se ha reportado que la diferenciación escamosa es el rasgo morfológico más fuertemente asociado a la cascada Wnt. Hallamos además que esta transdiferenciación es más frecuente (75% vs 32%, $p < 0,2$) en tumores que han atravesado largos períodos de latencia. Concordantemente hallamos que durante estos lapsos se seleccionan clones que sobreexpresan Fgf3. Estos resultados muestran la posibilidad de utilizar la morfología tumoral como diagnóstico de activación cascada de señales específica aún en animales no manipulados genéticamente.

216. (4018) LA GTPASA RALA MODULA EL SPREADING Y LA CAPACIDAD INVASIVA EN FIBROBLASTOS MURINOS TRANSFORMADOS. KRASNAPOLSKI, MARTIN; ADAM, ALEJANDRO; PURICELLI, LYDIA; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA

Instituto de Oncología A. H. Roffo

Anteriormente demostramos que la desorganización del citoesqueleto y la modificación de componentes de la matriz extracelular y secreción de proteasas inducidas en fibroblastos NIH3T3 por la sobreexpresión de v-Ras, v-Raf y v-Src depende en gran medida de la actividad RalA. Asimismo, esta GTPasa es necesaria para la sobrevida y la tumorigénesis de estas células. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la actividad RalA está involucrada en el control de la extensión sobre sustrato (spreading) y de la capacidad invasiva, mediante la utilización de células NIH3T3 sobreexpresando los oncogenes v-Ras, v-Raf ó v-Src y coexpresando o no S28N-RalA, una mutante dominante negativa de RalA. La capacidad de spreading se determinó por observación en microscopio de contraste de fase y recuento de células con proyecciones luego de 1 y 3 horas de incubación. La invasividad se ensayó en geles de colágeno I tridimensionales y observación por microscopía confocal luego de tinción con una solución de yoduro de propidio. El spreading celular a la hora de incubación inducido por v-Ras (83%) y v-Src (62%), pero no por v-Raf (76%), se vio disminuido significativamente por la inhibición de RalA (v-Ras/S28N-RalA 16%, $p < 0,01$; v-Src/S28N-RalA 17%, $p < 0,01$; v-Raf/S28N-RalA 70%, $p > 0,1$). A las 3 horas, todos los tipos celulares presentaron un porcentaje de spreading cercano al 100%. En cambio, S28N-RalA inhibió parcialmente (55% de inhibición) la invasividad en geles de colágeno inducida por v-Src ($p < 0,03$), no modificó la inducida por v-Ras ($p > 0,4$) y, sorprendentemente, potenció la invasividad por v-Raf (177% de aumento, $p < 0,0001$). Estos resultados nos permiten sugerir la presencia en fibroblastos de dos vías regulatorias de la capacidad de spreading y de la invasividad celular, una dependiente y otra independiente de la actividad RalA, según sea el oncogén sobreactivado.

217. (4034) MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE CARCINOMA PANCREÁTICO POR HISTAMINA. CRICCO, GRACIELA;

MARTIN, GABRIELA; MEDINA, VANINA; NUÑEZ, MARIEL; COCCA, CLAUDIA; GUTIERREZ, ALICIA; BERGOC, ROSA; RIVERA, ELENA

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

En la línea PANC-1 la histamina (Hi) en altas dosis y a través de receptores RH2 vía AMPc-PKA, inhibe la proliferación (arresto del ciclo en Go/G1) sin inducir apoptosis pero aumentando la expresión de marcadores de diferenciación. Este mecanismo involucra la vía de las MAPK con la activación de p38 e inhibición de ERK1/2. Con el objetivo de profundizar los mecanismos involucrados en la acción de la Hi se realizaron estudios de proliferación mediante la formación de colonias; se determinó la expresión de Histidina decarboxilasa (HDC), Bcl-2 y p53 por Western blot; la Hi endógena se evaluó por RIA e inmunofluorescencia, y los receptores RH3 por RT-PCR y por inhibición de la respuesta a Forskolina (Fk). Los resultados de proliferación indican: control (100%), Hi 0.01 μM ($140 \pm 6\%$); el inhibidor de la PLC U73122 1 μM ($60 \pm 5\%$); Hi 0.01 μM + U73122 1 μM ($90 \pm 8\%$), Hi 10 μM ($52 \pm 4\%$). ANOVA, $\#p < 0,05$, $*p < 0,01$. La expresión de HDC es elevada y no se modifica por distintos tratamientos, mientras que Bcl-2 aumenta por acción de Hi 10 μM y Agonistas H2. El contenido endógeno de Hi fue 6 ± 2 pmol/106 células, la localización fundamentalmente citoplasmática y la liberación de Hi al medio de 1-4 nM. Concluimos que la Hi a bajas dosis produce un aumento del recambio de fosfoinosítidos con EC50 de 0.05 μM y estimulación de la proliferación celular vía PLC. Como postulamos anteriormente estos efectos son mediados por los RH1 ya que esta línea celular no expresa RH3. El carcinoma de páncreas se caracteriza por una alta expresión de p53 y baja de Bcl-2, como muestran estos resultados y el aumento de Bcl-2 inducido por Hi estaría asociado con la activación parcial de la diferenciación celular.

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ORAL

ENDOCRINOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN V

218. (3367) EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO (LPS) EN RATAS MACHO SOBRE LA CONDUCTA SEXUAL DE LA HEMBRA. TESLER, LEONEL DAMIAN; KREPLAK, NICOLÁS; ZADOFF, ROMINA; KOHAN, DANA; ARIAS, PABLO

Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción, Depto de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA

El LPS inhibe la lordosis en ratas hembras, pero carece de efectos sobre la conducta sexual masculina. La testosterona (T[0]), cuya secreción disminuye por el LPS, interviene en la atracción que los machos ejercen sobre el sexo opuesto. Objetivo: evaluar 1) los efectos de la administración de LPS en machos sobre la conducta sexual y locomotora de la hembra; 2) el rol de la T[0] en los cambios inducidos por el LPS sobre la atracción de los machos sobre las hembras. Animales y métodos: ratas Wistar mantenidas en condiciones estándar, hembras ovariectomizadas y reemplazadas con estrógenos y progesterona. Para el estudio de conducta sexual se utilizó una versión modificada del paradigma de preferencia de pareja de Avistur e Yirmiya. La conducta locomotora se evaluó mediante la prueba de "open field". Diseño experimental: 1) LPS en machos y conducta sexual en hembras: se dividió a los machos en dos grupos (LPS vs control). En los brazos del dispositivo se colocó viruta de las jaulas de sendos grupos. En la jaula de apareo se alternaron machos de ambos grupos. Se evaluó preferencia sexual, lordosis y motilidad en las hembras. 2) LPS y T[0] en machos y preferencia de pareja en hembras: Un brazo del dispositivo se alfombró con viruta de machos tratados con LPS. En el otro se colocó viruta de machos tratados con LPS + T[0]. Se midió preferencia

de pareja y conducta locomotora. Se repitió a los 7 y 14 días. Resultados: 1) las hembras prefirieron la viruta de los machos control por sobre la de los inyectados con LPS, la conducta locomotora fue mayor en las ratas que habían compartido la jaula con los machos control y no se observaron diferencias en el cociente de lordosis. 2) en los días 7 y 14, las hembras prefirieron a los machos con LPS + T[0]. No hubo diferencias entre grupos en el día 0. Conclusiones: 1) la administración de LPS en machos modifica la preferencia de pareja y la conducta locomotora en las hembras; 2) estos efectos son revertidos por la testosterona.

219. (3390) MODULACIÓN DE LA OXÍDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL POR LAS HORMONAS TIROIDEAS DURANTE LA PROLIFERACIÓN HEPÁTICA. FINOCCHIETTO, PAOLA; FRANCO, MARIA CLARA; LEVISMÁN, DAMIAN; CARRERAS, MARIA CECILIA; PODEROSO, JUAN JOSE

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, UBA

La óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) modula la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y consecuentemente el estado redox, participando en la regulación del ciclo celular. Una dosis aislada de T3 estimula la proliferación hepática (máxima a 18 hs) vía ciclina D1 que asimismo depende de la condición redox. El objetivo fue demostrar que T3 estimula la proliferación hepática a través de la modulación de la expresión y la actividad de la mtNOS y de la concentración de H_2O_2 . Se extrajo el hígado de ratas Wistar machos de 250-300gr para aislamiento y purificación de mitocondrias a 0-6-18-36 y 48 hs post inyección intraperitoneal de 60 ug T3/100gr de peso. La mtNOS se detectó por western blot con anticuerpos anti-nNOS y la actividad se midió con [3H] L-arginina. La producción de H_2O_2 mitocondrial se determinó por espectrofluorometría. La actividad de mtNOS (en pmoles [3H]-citrulina/min./mg proteína) alcanzó la máxima disminución a las 18 hs post-T3 (19 ± 3) con respecto al control basal (55 ± 1.6 , $p < 0.001$) coincidiendo con la mínima producción de H_2O_2 (nmoles H_2O_2 /min/mg proteína, 0 h: 0.03 ± 0.0001 , 18hs: 0.0001 ± 0.000001) ($p < 0.001$). A las 48 hs, la actividad enzimática mostró un efecto rebote (96.5 ± 10 , $p < 0.001$ vs 0) coincidiendo con la máxima producción de H_2O_2 (0.27 ± 0.01) ($p < 0.05$). No se observaron variaciones por T3 en la expresión de mtNOS ni hubo modificaciones en la actividad de complejos mitocondriales o de las enzimas antioxidantes (SOD, GPX, catalasa). Concluimos que el efecto proliferativo de T3 a las 18 hs se debe a la inhibición transitoria de la actividad de mtNOS y la disminución de la producción de H_2O_2 que condicionaría una mayor expresión de ciclina D1 y que, el ulterior arresto del "burst" proliferativo se asocia a cambios opuestos.

220. (3434) MODULACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL (MTNOS) Y DEL METABOLISMO REDOX CELULAR POR EL ESTADO TIROIDEO. FRANCO, MARIA CLARA; ANTICO ARCIUCH, VALERIA G.; PERALTA, JORGE G.; LEVISMÁN, DAMIÁN M.; PODEROSO, JUAN JOSÉ; CARRERAS, MARÍA CECILIA

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

El consumo de oxígeno sistémico (BMR) y la proliferación celular son regulados por el estado tiroideo. El óxido nítrico (NO) producido por mtNOS es un modulador fisiológico de la respiración mitocondrial y del metabolismo redox celular. La reciprocidad entre ambos efectos se analizó en hipo e hipertiroidismo en 4 grupos de ratas Wistar machos: control (C), hipotiroideas (Hipo; metimazol 0.02% en agua a beber), eutiroideas (Eut; Hipo + 1 dosis/día 15 µg T3/kg x 3 días) e hipertiroideas (Hiper; 1 dosis/día 60 µg T3/kg x 3 días). El estado tiroideo de cada grupo (n=7) se confirmó mediante la determinación del BMR: en ml/Kg(0.75).min, C: 16.0 ± 0.1 ; Hipo: $11.0 \pm 0.4^*$; Eut: 17.8 ± 0.1 ; Hiper: $23.4 \pm 0.2^*$ (* $p < 0.01$). La actividad y contenido de mtNOS en hígado se

halló aumentada en Hipo, con respecto a C: (en pmoles citrulina/mg prot.min), C: 40 ± 7 ; Hipo: 75 ± 13 ($p < 0.05$); Eut: 42 ± 6 ; Hiper: 46 ± 5 ; a igual actividad, el contenido de mtNOS en Hiper se halló disminuido con respecto a C. La velocidad de producción y concentración de $H[2]O[2]$ dependiente de NO en el estado estacionario disminuyó en Hiper respecto a C: (en $x10^{-9}$)M C: 0.1; Hipo: 0.09; Eut: 0.1; Hiper: 0.04. No se observaron diferencias significativas en la actividad de complejos de la cadena respiratoria ni de Mn-SOD. En Hipo, se observó nitración de proteínas coincidente con formación de peroxinitrito. El "signaling" dependiente del estado redox demostró la activación preferencial de p38 MAPK sobre ERK1/2 (expresada como relación PERK / Pp38) en Hipo y lo opuesto en Hiper: C: 1,0; Hipo: 0.52; Eut: 0.75; Hiper: 1.24. Los resultados sugieren a) que el estado tiroideo participa a través de la modulación de la concentración y actividad de mtNOS y $H[2]O[2]$ en la regulación del metabolismo redox celular y en la activación diferencial de MAPKs b) en hipotiroidismo, la formación de peroxinitrito limitaría el aumento de $H[2]O[2]$ dependiente de NO y podría activar p38 MAPK.

221. (3456) EFECTOS DE GHRELINA (GHR) SOBRE LA FUNCIÓN CORTICOADRENAL IN VITRO EN CONDICIONES DE BALANCE ENERGÉTICO NORMAL Y NEGATIVO. GIOVAMBATTISTA, ANDRES^{1,2}; PIERMARÍA, JUDITH¹; SUESCUN, MARIA OLGA^{1,2}; CALANDRA, RICARDO SAUL^{1,2,3}; SPINEDI, EDUARDO¹

¹Instituto Multidisciplinario de Biología Celular; ²Dto Cs Biol, Fac Cs Exactas UNLP; ³Instituto de Biología y Medicina Experimental CONICET

Ghr, péptido estomacal secretagogo de GH, posee actividad orexigénica. El objetivo de este estudio fue evaluar la existencia de una posible interrelación entre Ghr y glucocorticoides adrenales in vitro. Con este fin, utilizando ratas Fischer macho adultas, evaluamos el efecto de Ghr (1-100nM) sobre la liberación de corticosterona (B) en células adrenales (CA) totales, incubadas durante 120 minutos, en condiciones basales y post-ACTH (2,2-220 pM). Todas las concentraciones de ACTH indujeron un aumento significativo ($P < 0,05$) en la liberación de B sobre el basal. La presencia de Ghr 1 nM no alteró la secreción de B basal y post-ACTH. Sin embargo, las concentraciones 10 y 100 nM de Ghr inhibieron significativamente ($P < 0,05$) la producción de B: Ghr 10 nM disminuyó la liberación de B post-220 pM ACTH ($13,22 \pm 0,4$ vs $15,75 \pm 0,46$ ng/10exp.5, $P < 0,05$) sin alterar la liberación basal y post-estímulo con ACTH (2,2 y 22 pM); Ghr 100 nM disminuyó la secreción basal y post ACTH (basal: $0,91 \pm 0,09$ vs $1,93 \pm 0,2$; ACTH 220 pM: $11,81 \pm 0,48$ vs $15,75 \pm 0,46$ ng/10exp.5 cel, $P < 0,05$). Por otro lado, se evaluó el efecto de Ghr sobre CA provenientes de ratas ayunadas (AY) por 96 hs. Las CA-AY, resultaron hiperrespondientes ($P < 0,05$) a la ACTH vs. las CA normales, mientras que la presencia de Ghr (1-100 nM) no alteró la liberación de B, basal y post-ACTH. De los resultados obtenidos en el presente estudio podemos concluir que: a) Ghr ejerce una acción inhibitoria, dependiente de su concentración, sobre la liberación de B en CA normales, y b) en condiciones energéticamente desfavorables, ayuno prolongado, la adaptación se manifiesta por hiperproducción adrenal de glucocorticoide, no susceptible al efecto inhibitorio de Ghr. (Carrillo-Oñativia 02-03 y PICT 5191/99)

222. (3531) INTERACCION ENTRE LOS SISTEMAS DE GENERACION DE OXIDO NITRICO Y MONOXIDO DE CARBONO EN LA CORTEZA ADRENAL COMO PARTE DE LA RESPUESTA AL LPS. GRION, NATALIA; POMERANIEC, Yael; PIGNATARO, OMAR; CYMERYNG, CORA

IBYME-CONICET Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina.UBA

Múltiples coincidencias entre los sistemas de óxido nítrico sintasa (NOS) y hemo oxigenasa (HO) sugieren una regulación coordinada entre ambos. En ese sentido el objetivo del presente trabajo fue estudiar, con un enfoque farmacológico, la interacción

entre ambos sistemas en la ZF de adrenal de ratas controles y estimuladas con LPS. Se realizaron los siguientes tratamientos: Inyección ip con a) LPS (500µg/Kg); b) L-NAME (100mg/Kg) (L-N, inhibidor de la NOS); c) LPS + L-N; d) Sn-Protofiorina IX (40mg/Kg) (SnPP, inhibidor de la HO); e) LPS + Sn-PP; f) salina y sacrificio 18h post-inyección. Ni la Sn-PPIX tuvo efecto sobre la actividad de NOS ni el L-N sobre la de HO cuando se determinó el efecto "in vitro" de los inhibidores. Los resultados indicaron que el L-N inhibió significativamente la actividad de HO en los controles y en los animales estimulados con LPS (en pmol/mg prot C: 86.33 ± 18.2; LPS: 282.7 ± 6.3 p < 0,001 vs C; L-N: 22.66 ± 6.1; LPS + L-N: 201,67 ± 10.3 p < 0,01 vs LPS). Por el contrario, el tratamiento con Sn-PP aumentó significativamente la actividad de NOS en los controles y en los animales estimulados con LPS (en pmol/min/mg prot: C: 60,77 ± 1,9; LPS: 121,25 ± 1,49; Sn-PPIX: 124,74 ± 1,21 p < 0,001 vs C; LPS + Sn-PPIX: 202,68 ± 5,52 p < 0,001 vs LPS). El enfoque farmacológico utilizado sugiere que la actividad de NOS, posiblemente el NO producido, regula la actividad de HO o su expresión. Una posibilidad es la interacción del NO con el grupo hemo de la NADPH-citocromo P450 reductasa. Por otra parte, la actividad de HO podría modular la de NOS por utilizar a su grupo hemo como sustrato. En resumen, los resultados nos indican la existencia de un cross-talk significativo entre ambos sistemas de generación de moduladores.

223. (3548) HEMO OXIGENASA Y ESTRES OXIDATIVO EN CELULAS ADRENALES. POMERANIEC, YAEL; PANNUNZIO, VANESA; CYMERYNG, CORA

Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA

El monóxido de carbono (CO), postulado como modulador de la fisiología endócrina, es sintetizado por la enzima hemo oxigenasa (HO) a partir de hemo produciéndose además bilirrubina y hierro. En trabajos previos caracterizamos las diferentes isoformas de la HO en células adrenales y demostramos un aumento de su actividad por ACTH. Se ha postulado que la HO participa en los mecanismos de defensa celular contra el estrés oxidativo. En base a esto, nuestro objetivo fue evaluar si la inducción de HO por ACTH responde a mecanismos de citoprotección contra el estrés oxidativo generado por el incremento en el metabolismo producido por ACTH. Los resultados indicaron una disminución significativa en los niveles de TBARS y carbonilos (índices de peroxidación lipídica y oxidación de proteínas) producidos por H₂O₂ cuando las células se incubaron en presencia de ACTH (TBARS en nmol/mg: C:109.6 ± 5, H₂O₂: 294 ± 51*, ACTH: 92.8 ± 11, ACTH H₂O₂: 115.5 ± 12, *p<0.01 vs C n=4; Carbonilos en nmol/mg: C: 1.34 ± 0.2, H₂O₂: 2.91 ± 0.31*, A: 1.18 ± 0.24, A H₂O₂: 0.54 ± 0.11, *p<0.01 vs C n=5). Este efecto citoprotector se reproduce cuando las células fueron incubadas en presencia de bilirrubina. Por otra parte, la incubación en presencia de ACTH produjo una disminución significativa de la actividad de catalasa durante las primeras 3 h volviendo al valor control a tiempos mayores. En cuanto a la inducción de la expresión de HO por ACTH demostramos que la preincubación en presencia de melatonina o bilirrubina, ambos con reconocida actividad antioxidante, previene la inducción dependiente de ACTH de la expresión de HO. En conclusión, los resultados sugieren que la inducción de HO por ACTH correlaciona con un aumento de estrés oxidativo que es atenuado cuando se incrementa ésta actividad enzimática.

224. (4043) EFECTO DEL AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE LA RESPUESTA CORTICOSUPRARRENAL A ESTRESORES INEVITABLES. TESLER, LEONEL¹; LORES ARNAIZ, MARIA DEL ROSARIO³; SARUDIANSKY, MERCEDES³; FANTON, MAXIMILIANO³; GALEANO, PABLO³; de EZCURRA, MARIA¹; CYMERYNG, CORA²; ARIAS, PABLO¹

Departamentos de Fisiología¹ y Bioquímica Humana², Facultad de Medicina Laboratorio de Psicología Experimental³, Facultad de Psicología, Universidad de Buenos Aires

El estrés deteriora la memoria de trabajo (MT) y la exposición a ambiente enriquecido (AE) aminora ese deterioro. Nuestro objetivo fue investigar si la exposición previa a un AE modifica los niveles de corticosterona basales o estimulados por estresores inevitables. Ratas macho Sprague Dawley (21 días de edad) fueron asignadas a un AE (jaulas de 50 x 98 x 54 cm con rampas, galerías y 5 objetos renovados diariamente) o a ambiente común (AC). La mitad de cada grupo recibió 8 días de manipulación y 8 de moldeamiento en un laberinto radial de 8 brazos. Evaluamos aprendizaje (reconocimiento de los brazos conteniendo comida) y emocionalidad negativa (EN, número de defecaciones durante la prueba). A los 42 días se colocó una cánula yugular, se extrajo una muestra de sangre 15 min tras iniciar la anestesia. Al mediodía siguiente las ratas fueron estresadas (inmovilización) obteniéndose sangre antes y 10-40 min después. Se midió corticosterona sérica por RIA. Utilizamos pruebas paramétricas (Student) y no paramétricas (Mann-Whitney) para la evaluación estadística de los resultados. Entre los días 1 y 8 de moldeamiento únicamente los animales de AE aumentaron significativamente (p=.042) el % de brazos correctos y disminuyeron (p= .015) el número de defecaciones. Los niveles basales de C fueron algo más elevados en los animales AE que en los AC (p=.0683). No se registraron diferencias entre ambos grupos en la respuesta a los estresores (éter + cirugía o inmovilización). Los resultados de la prueba conductual corroboran la importancia del AE para la adquisición de MT, y la disminución de la EN. La presentación de una situación adversa (estresor) no habitual desencadena sin embargo una respuesta similar del eje corticosuprarrenal en ambos grupos.

TRANSDUCCION DE SEÑALES I

225. (3239) CO INHIBE LA ENTRADA CAPACITATIVA DE CALCIO EN PLAQUETAS HUMANAS. GENDE, OSCAR ALFREDO

Facultad de Ciencias Medicas Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Universidad Nacional de la Plata

El sistema hemo oxigenasa-monóxido de carbono (CO) gana rápida aceptación como vía fisiológica de transducción de señales. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de CO sobre la entrada de calcio inducida por ADP 100 µM o Thapsigargin 0.1 µM (TG), para establecer si los agonistas que aumentan el cGMP tienen o no una acción inhibitoria directa sobre la entrada capacitativa de calcio. Plaquetas cargadas con FURA 2 se incubaron a 37 °C por 200 seg. en una solución salina que contenía Cl[2]Ca 1 mM sin modificar (Control) o previamente saturada con CO. Después de la estimulación con ADP, [Ca²⁺]_i alcanzó un pico de 271 ± 26 nM vs 176 ± 8 nM ** (** indica Control vs CO respectivamente, apareados, P < 0.05). Esta señal de calcio decayó con una constante de tiempo de 44 ± 12 seg. vs 27 ± 6 seg**. Cuando se comenzó el experimento en ausencia de calcio extracelular, ADP produjo una movilización desde los depósitos que elevó [Ca²⁺]_i en 154 ± 15 nM vs 93 ± 10 nM ** y una entrada posterior en Cl[2]Ca 1 mM que elevó [Ca²⁺]_i en 88 ± 17 nM vs 52 ± 13 nM **. El vaciamiento de depósitos de calcio con TG permitió, cuando se aumentó su concentración en el medio, la entrada de iones bivalentes elevando [Ca²⁺]_i en 888 ± 260 nM vs 396 ± 81 nM ** y produciendo la entrada de Mn²⁺ que apagó la fluorescencia del indicador con una pendiente de 143 ± 16 vs 114 ± 18 unidades arbitrarias. **. Se concluye que CO participa en el control de la entrada capacitativa de calcio indirectamente acelerando la retoma por los depósitos y directamente frenando su ingreso. Estos resultados sugieren que el sistema hemo oxigenasa-CO endógeno podría tener un papel importante en la regulación de la función plaquetaria

226. (3530) SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN ESTIMULADAS POR EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF) INVOLUCRADAS EN LA PROLIFERACIÓN DE CARCINOMAS MAMARIOS. RIVAS, MARTÍN;

CARNEVALE, ROMINA; SALATINO, MARIANA; PROIETTI, CECILIA; CHARREAU, EDUARDO H; ELIZALDE, PATRICIA V; SCHILLACI, ROXANA

Instituto de Biología y Medicina Experimental

En células de cáncer de mama se han reportado respuestas variables al TNF. En las células C4HD, provenientes de un carcinoma de mama murino progéstágeno-dependiente, hemos encontrado que el TNF induce su proliferación y que la vía de ERK1/2 está involucrada. El objetivo de este trabajo fue estudiar otras vías de transducción de señales activadas por TNF y compararlas con las inducidas en la línea MCF-7, en la cual el TNF inhibe la proliferación. Las células se cultivaron durante 48 hs con TNF en presencia o ausencia de inhibidores específicos de las vías p38, JNK o PI3K/AKT: SB203580, SP600125 o Wortmanina (W) respectivamente, y la proliferación se determinó por incorporación de (3)H timidina. La activación de las vías se determinó entre 0-60 min de estimulación con TNF, por ensayos de Western blot utilizando anticuerpos contra la forma fosforilada de cada quinasa. En células C4HD el TNF indujo un incremento en la fosforilación de JNK y de AKT (2.5 ± 0.5 y 2.6 ± 0.7 veces respectivamente a los 30 min), mientras que la fosfo-p38 no varió. El efecto proliferativo del TNF en C4HD ($64 \pm 7\%$, $P < 0.001$) fue inhibido totalmente por W y parcialmente por SB mientras que SP aumentó la proliferación. En MCF-7 el TNF indujo la fosforilación de p38 y JNK a los 15 min (14 ± 4 y 7 ± 2 veces respectivamente) pero la fosfo-AKT no varió. El efecto inhibitorio del TNF sobre la proliferación de MCF-7 ($-47 \pm 6\%$, $P < 0.001$) revirtió en presencia de SB y de SP mientras que W aumentó la inhibición inducida por el TNF. Estos resultados muestran por primera vez que la activación de PI3K/AKT está involucrada en la proliferación inducida por TNF en cáncer de mama; por el contrario el efecto inhibitorio del TNF sobre la proliferación estaría vinculado con la activación de vías p38 y JNK.

227. (3568) SISTEMAS DE GENERACION DE OXIDO NITRICO (NO) Y MONOXIDO DE CARBONO (CO) EN LA CORTEZA ADRENAL: EFECTO DE LA ESTIMULACION "IN VIVO" CON LIPOPOLISACARIDO. GRION, NATALIA; POMERANIEC, Yael; PIGNATARO, OMAR; CYMERYNG, CORA

IBYME-CONICET Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA

Si bien la función adrenal se regula principalmente por ACTH, puede modularse en forma autócrina y/o parácrina. En ese sentido demostramos que el NO inhibe la esteroidogénesis adrenal basal y estimulada por ACTH y sugerimos que el CO, producto de la actividad de hemo oxigenasa (HO) ejerce el mismo efecto. En trabajos previos estudiamos la expresión de NOS y de HO en ZF adrenal de rata y la inducción de iNOS y HO-1 frente a diferentes estímulos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la estimulación "in vivo" con LPS (500µg/Kg, i.p.) sobre la actividad de NOS y HO. El tratamiento incrementó significativamente la actividad de HO luego de 12 h (C: 206 ± 27 pmoles b./mg prot vs LPS: $508,7 \pm 81$ $p < 0,01$ n=3). El análisis por inmunoblot mostró un incremento de los niveles de HO-1 luego de 6 h sin afectarse los de HO-2. Los niveles de ARNm de HO-1 aumentaron a partir de las 3 h disminuyendo a las 12 h a niveles basales. La actividad de NOS aumentó significativamente a las 6 h (LPS: $102,3 \pm 10$ vs C: $67,5 \pm 0,9$ $p < 0,01$ n=3). En condiciones basales se observaron las isoformas constitutivas de NOS (eNOS y nNOS) y bajos niveles de iNOS, pero 18 h luego del tratamiento se observó un incremento en los niveles de iNOS. Los niveles de ARNm para nNOS y eNOS aumentaron a las 6 h volviendo a los valores control a partir de las 12 h. Sólo se observó la expresión del ARNm de iNOS, a las 3 y 6 hs, siendo indetectable a tiempos mayores. Los resultados obtenidos demuestran la coexistencia de las isoformas constitutivas de ambas enzimas en condiciones basales y el incremento en las actividades de NOS y posteriormente de HO luego del estímulo con

LPS, posiblemente a expensas de la inducción de las isoformas HO-1 e iNOS.

228. (3623) EL TRYPANOSOMA CRUZI EJERCE EFECTOS DE SOBREVIDA EN CULTIVOS DE CARDIOMIOCITOS A TRAVÉS DE CRUZIPAÍNA, LA QUE ACTIVA LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR ERK 1-2 Y PI-3K/AKT. AOKI, MARIA DEL PILAR; PELLEGRINI, ANDREA; GUIÑAZÚ, NATALIA; TANOS, TAMARA; COSO, OMAR; GEA, SUSANA

Facultad de Ciencias Químicas. UNC.

Crecientes evidencias demuestran que el parásito es capaz de modular vías de transducción de señales a los fines de asegurar la supervivencia de la célula hospedadora, mecanismos que no han sido explorados en miocitos cardíacos. Previamente demostramos que el cruzipaína, incrementa la supervivencia de cardiomiocitos por medio de la up-regulación de Bcl-2 y arginasa-II. Objetivo: Dilucidar el efecto de la infección con T. cruzi en la sobrevivencia de cardiomiocitos, y analizar las vías de señalización inducidas en el efecto antiapoptótico de cruzipaína en este tipo celular. Resultados: Cultivos primarios de cardiomiocitos fueron incubados con tripomastigotes y sometidos a privación de suero (1% SBF), evaluándose la tasa de apoptosis y el grado de infección intracelular por recuento de amastigotes identificados por inmunocitoquímica. Se encontró que los cultivos infectados incrementaron la viabilidad celular dosis de parásito-dependiente. Notablemente, este efecto protector fue incrementado por la preincubación con cruzipaína ($p < 0,02$). Al analizar las vías de señalización inducidas por cruzipaína, la viabilidad celular fue: 57.2% (DMEM); 92.2% (cruzipaína); 57.6% (PD 98059 inhibidor de (i) ERK 1-2); 92.9% (SB 203580, i p38 MAPK); 48.9% (Ly 294002, i PI-3K). Resultados corroborados por TUNEL. La activación de las vías ERK1-2 y PI-3K/Akt fue confirmada por inmunoblots revelando ERK y Akt fosforiladas. Conclusión: el T. cruzi ejerce efectos de supervivencia sobre cardiomiocitos y este efecto es reproducido por el tratamiento con cruzipaína la cual estimula las vías de señalización mediadas por ERK 1-2 y PI-3K/Akt pero no por p38 MAPK.

229. (3702) ROL DE LA P38 MAPK EN LA MODULACIÓN DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL GR. FRANCO, DIANA LORENA; TANOS, TAMARA; DOMAICA, CAROLINA; COSTAS, MONICA; COSO, OMAR

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular Laboratorio de apoptosis y biología molecular. Hospital Dr. Alfredo Lanari, UBA

El receptor de glucocorticoides (GR) es un receptor de hormonas esteroideas capaz de regular tanto directa como indirectamente genes que están involucrados en la diferenciación celular, en la selección tímica y en la inflamación. Si bien el cortisol actúa como primera señal en la activación de las funciones regulatorias del receptor, la activación transcripcional del GR también es modulada por fosforilación, siendo esta última llevada a cabo entre otras por, proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Los miembros más representativos de esta familia son Erk2, JNK y p38. El objetivo del presente trabajo fue investigar el rol de p38 en la regulación de las actividades biológicas del receptor de glucocorticoides. Resultados: Nosotros observamos una interacción física entre el GR y p38, JNK y Erk2 a través de ensayos de co-inmunoprecipitación. También observamos que el GR es sustrato de fosforilación de p38, JNK y Erk2 en ensayos de fosforilación in vitro. Células L-929 estimuladas con TNF- α y Dexametasona (Dex) mostraron colocalización de p38 y GR en núcleo por diversas técnicas como microscopía confocal y western-blots de fracciones subcelulares. Se pudo observar una activación transcripcional del GR cuando células L-929 fueron transfectadas con MKK6, un activador de la vía de p38, y esta activación se vio disminuida en presencia del inhibidor específico de p38 (SB203580). Finalmente con el objetivo de determinar

las consecuencias de esta interacción en el destino celular, observamos una disminución en la sobrevivencia de las células tratadas con TNF- α + Dex + SB203580, comparada con el tratamiento con TNF- α + Dex. Conclusión: La p38 interactúa con el GR, induce su fosforilación, incrementa su actividad transcripcional y media el rol protector del GR a la apoptosis inducida por TNF- α . Este trabajo abre nuevas perspectivas en el estudio de cascadas de transducción de señales que regulan al GR y p38 las cuales pueden ser relevantes para el desarrollo de órganos o la diferenciación celular.

GASTROENTEROLOGIA I

230. (3227) MECANISMO COX.2 - COX.3 EN EL DAÑO GASTROINTESTINAL INDUCIDO POR AINES, EN RATAS.

LAUDANNO, OSCAR MIGUEL; SAN MIGUEL, PATRICIA; ARAMBERRY, LUCIANO; CESOLARI, JOSÉ

Sala XV - Hospital Centenario Gastroenterología Experimental. Facultad de Ciencias Médicas. UNR.

La clonación de la COX.3 y su inhibición selectiva con Paracetamol (Pa), nos permitió evaluar a la COX.3 en el daño gastrointestinal. Grupos aleatorios de ratas Wistar (n=7 c/grupo), 200g, ayuno 24 hs., excepto agua ad-libitum; se realizaron los experimentos: 1. Fisiol. 1 ml por sondaje orogástrico (OG), en bolo y se esperó 24 hs. 2. Ketorolac (Ke) 5 mg/Kg SC (inhib. COX.1). 3. Etoricoxib (Eto) 50 mg/Kg OG (inhib. COX.2). 4. Pa 500 mg/Kg IP. 5. Ke + Eto. 6. Ke + Pa. 7. Eto + Pa y 8. Ke + Eto + Pa. Las ratas fueron sacrificadas con sobredosis de éter, laparotomía, gastrectomía y enterectomía total; se tabuló % área lesional macroscópica gástrica y erosiva intestinal (mm²); posterior histología (H.E.) se calculó la t Student y el ANOVA. El % área lesional gástrica dio: 1, 2, 3, 4 y 6: 1.0 \pm 1.0 (ns); 5: 10.1 \pm 1.2 (< 0.02); 7: 5.2 \pm 0.6 (< 0.03) y 8: 4.7 \pm 0.5 (< 0.03). El n° de erosiones en intestino delgado (ID) dio: 1, 2, 3, 4 y 6: 1.0 \pm 0.1 (ns); 5: 110 \pm 16 (< 0.01); 7 y 8: 1700 \pm 120 (< 0.001). La histología sólo mostró necrosis glandular gástrica en 5, 7 y 8; erosiones ID en 5 y necrosis masiva en 7 y 8. La inhibición COX.2 - COX.3 dio marcado daño intestinal y poco gástrico; en cambio, la inhib. COX.1 - COX.2 dio prevalente daño gástrico y poco intestinal.

231. (3248) AGREGACIÓN PLAQUETARIA IN VIVO EN UN MODELO DE HIPERTENSIÓN PORTAL PREHEPÁTICA Y SU MODIFICACIÓN POR DOSIS ULTRABAJAS DE ASPIRINA. EIZAYAGA, FRANCISCO; AGUEJOUF, OMAR; BELON, PHILIPPE; DOUTREMEPUICH, CHRISTIAN

E. Ríos 1407, Olivos Laboratoire d'Hématologie, Faculté de Pharmacie, Université de Bordeaux II « Victor Segalen ».

Una de las principales complicaciones de la hipertensión portal (HP) es la hemorragia digestiva. Tradicionalmente se atribuye la tendencia a las hemorragias a la cirrosis y las alteraciones en la síntesis de los factores de coagulación. Se evalúa la participación de la agregación plaquetaria (AP) in vivo en un modelo de HP prehepática sin cirrosis y su modificación por dosis ultra bajas de aspirina. Se utilizaron ratas Wistar macho, de 220g. G1: Operación simulada (Sh) + placebo (Sol. Fis. 0.2ml, vsc.). G2: Sh+ASA (0.2ml subcutánea). G3: Ligadura parcial de vena porta (LP)+placebo. G4: LP+ASA. AP in vivo por un método de trombosis inducida por un láser de argón (Laser Spectra-Physics, 514.5nm, 4W, diámetro del haz: 2 μ m) expresada como duración de la embolización y número de émbolos y en agregómetro (Amplitud y velocidad; con ADP 5 μ M). Tiempo de Sangría (THP). KPTT. Tiempo de Quick. Fibrinógeno. ASA: 0.2 ml de una solución de 334 x 10⁻¹¹ mol/ml (1). Noémbolos. G1: 5.71 \pm 2.21; G3: 2.44 \pm 1.51*. Duración de la embolización (min.): G1: 3 \pm 1.15; G3: 1.11 \pm 1.17*. THP (seg.): G1: 114 \pm 23.19; G3: 289 \pm 126.1*. Resto de los resultados: no se observan diferencias significativas. (Valores como media \pm D.S.; n= 6-9/grupo; * p=0.05; Prueba T). (1) Doutremepuich et al, Semin in Thromb and Homeostasis, vol 22, Supplem 1, 1996. La hipertensión portal

prehepática disminuye la AP medida in vivo, no observándose diferencias significativas en la AP realizada in vitro. Los cambios observados en la AP no se acompañan de variaciones en KPTT, Quick o Fibrinógeno. Es probable que sea necesario el contacto con el endotelio para hacer evidente esta alteración. El THP se encuentra aumentado en la HP. El ASA en dosis ultrabajas tiende a normalizar la AP in vivo, así como el THP.

232. (3503) ESTRÉS OXIDATIVO EN DOS MODELOS DE HIPERTENSIÓN PORTAL. ROMAY, SALVADOR; GONZALES, SOLEDAD; ERARIO, MARIA DE LOS ANGELES; CASTRO, JOSE LUIS; EIZAYAGA, FRANCISCO

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamentos de Ciencias Biológicas, Química Biológica, Farmacología, Farmacia y Bioquímica, UBA

El objetivo del trabajo fue comparar la generación de estrés oxidativo en hígado de rata utilizando dos modelos de hipertensión portal, tales como estenosis reglada de la vena porta (ERVP) y cirrosis biliar (CB) por doble ligadura y sección del conducto biliar (n= 6-8 por grupo). Se utilizaron ratas Wistar sacrificadas a los 14 y 28 días respectivamente (200-250 g), en las cuales se evaluó la aparición de estrés oxidativo por determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), el contenido de glutatión reducido (GSH) y la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Asimismo se evaluó la actividad y expresión de la hemooxigenasa-1 (HO-1). Se pudo observar en las ratas con CB un aumento de TBARS (130% *), una disminución de GSH (85% *), así como una significativa disminución de las enzimas CAT, SOD y GPx (30, 90 y 60%, respectivamente *). En cambio, la HO-1 mostró valores similares a los animales controles. En las ratas con ERVP no se encontraron modificaciones en los niveles de TBARS y GSH y tampoco en las actividades de CAT, SOD y GPx, observándose en cambio un incremento en la actividad de la HO-1 (40% *) (*= p<0.05 vs. control, Test t de Student). De los datos obtenidos se puede concluir que la inducción de la HO-1 observada en los animales con ERVP actuaría como defensa antioxidante. En cambio, en las ratas cirróticas, la ausencia de inducción de HO-1 desencadena la aparición de daño oxidativo.

233. (3585) EFECTO DEL INDUCTOR ESPIRONOLACTONA (E) SOBRE LA DEPURACIÓN SISTÉMICA DE 1-CORO-2,4-DINITROBENCENO (CDNB) EN RATAS. RUIZ, MARÍA LAURA; VILLANUEVA, SILVINA; SÁNCHEZ POZZI, ENRIQUE; LUQUITA, MARCELO; PELLEGRINO, JOSÉ; MOTTINO, ALDO; CATANIA, VIVIANA

IFISE (CONICET)-Fac. Cs. Bioq. y Farm. (UNR)

Previamente observamos que E aumenta la actividad de sistemas enzimáticos (entre ellos, glutatión S-transferasa que conjugó CDNB) y el contenido de la proteína transportadora de aniones orgánicos conjugados Mrp2, en hígado y en intestino delgado proximal de ratas. En este trabajo evaluamos la actividad del transportador Mrp2 hepático e intestinal en ratas Wistar macho adultas controles (C) y tratadas con E (200 μ moles/Kg peso/día, durante 3 días consecutivos, i.p.). La actividad de Mrp2 en hígado, evaluada in vivo administrando 10 μ moles de CDNB i.v./Kg peso y posterior detección del derivado conjugado dinitrofenil-glutatión (DNP-SG) en bilis, no mostró diferencias significativas entre grupos. La concentración plasmática de DNP-SG (μ M), determinada 5 min después de la inyección de CDNB, resultó significativamente mayor (n=3, p<0.05) en el grupo E (8.4 \pm 1.2) con respecto a C (5.6 \pm 0.9). La actividad de Mrp2 en intestino evaluada in vitro (modelo de saco intestinal sin evertir, sentido seroso-mucoso, CDNB 100 μ M en el medio de incubación) y expresada en nmoles de DNP-SG excretados después de 30 min/g tejido, resultó significativamente mayor en el grupo E (24 \pm 2) con respecto a C (17 \pm 4) (n =3, p<0.05). Conclusión: La actividad de transporte de Mrp2 se correlaciona con el mayor contenido de proteína inducido por E en intestino pero no en hígado. Los

datos de concentración plasmática de DNP-SG sugieren inducción de un transportador basolateral en mayor proporción que para Mrp2. El tratamiento con E puede acelerar el metabolismo y además la excreción extrahepática de diversos compuestos, por inducir enzimas de biotransformación y por aumentar el contenido y la actividad de proteínas transportadoras de los metabolitos conjugados.

234. (3598) REDISTRIBUCIÓN DE TRANSPORTADORES CANALICULARES EN LA COLESTASIS INDUCIDA POR ESTRADIOL-17 β -GLUCURÓNIDO EN LA RATA: ROL DEL SISTEMA MICROTUBULAR. CROCENZI, FERNANDO; VEGGI, LUIS MARÍA; ROMA, MARCELO GABRIEL; MOTTINO, ALDO DOMINGO

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) - CONICET - UNR

En trabajos previos demostramos que, en colestasis, los transportadores de membrana canalicular sufren redistribución hacia compartimientos endosomales, la cual se asocia con una disminución de su actividad secretora (Hepatology 35:1409; Am. J. Physiol. 285:G449). Los mecanismos involucrados en esta relocalización son desconocidos, pero pueden involucrar tanto una alteración de la inserción exocítica de transportadores de recambio (debida a disfunción microtubular) como una exacerbación de la internalización endocítica de los transportadores pre-existentes en la membrana apical. Para dilucidar este mecanismo, estudiamos los efectos del agente disruptor de microtúbulos colchicina (Colch; 0,2 μ mol/100 g p.c., i.v.) sobre la localización subcelular del transportador canalicular de aniones orgánicos Mrp2 en la colestasis inducida por estradiol-17 β -glucurónido (E[2]17G; 0,15 μ mol/100 g p.c., i.v.) en la rata, visualizado por inmunofluorescencia seguida de microscopía confocal. Colch no afectó per se el flujo biliar 100 min luego de su administración (2,19 \pm 0,04 vs 2,07 \pm 0,04 μ l/min/g híg, p>0,05), tiempo al cual se administró E[2]17G, ni la reducción del mismo ocasionada por E[2]17G 30 min luego de administración (% del valor basal: 8,7 \pm 1,0 vs 13,0 \pm 2,5; p>0,05). Colch per se no modificó la distribución subcelular de Mrp2 ni previno la redistribución del transportador inducida por E[2]17G. El hecho que, a diferencia de E[2]17G, Colch per se no induzca redistribución de Mrp2, hace improbable que los efectos de E[2]17G se deban a una alteración de la función microtubular con la consecuente alteración de la inserción exocítica de transportadores al polo apical. En cambio, E[2]17G parece inducir internalización endocítica de los transportadores pre-existentes en la membrana canalicular, a través de un mecanismo independiente de microtúbulos.

235. (3602) EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 (MRP2) EN HÍGADO, YEYUNO Y CORTEZA RENAL DE RATAS SOMÉTIDAS A HEPATECTOMIA PARCIAL. VILLANUEVA, SILVINA STELLA MARIS; RUIZ, MARIA LAURA; LUQUITA, MARCELO; SÁNCHEZ POZZI, ENRIQUE; PELLEGRINO, JOSÉ; TORRES, ADRIANA; CATANIA, VIVIANA ALICIA; MOTTINO, ALDO DOMINGO

Ifise (CONICET) Fac. Cs. Bioq. y Farm. (UNR)

El hígado es el principal sitio de excreción de xenobióticos conjugados con glutatión mediada por Mrp2. Se desconoce el papel alternativo del intestino y el riñón en condiciones de insuficiencia hepática. Se evaluó la expresión y actividad de Mrp2 en hígado (remanente), yeyuno y corteza renal en ratas Wistar macho adultas parcialmente (2/3) hepatectomizadas: 1 (HP1) y 7 (HP7) días después de la cirugía. La expresión de Mrp2, evaluada por western blot no varío respecto de las ratas sham (S) en ninguno de los tejidos, independientemente del tiempo estudiado. La actividad de Mrp2, evaluada in vivo administrando 30 μ mol de 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) i.v./Kg peso y posterior detección del derivado dinitrofenil glutatión (DNP-SG) por HPLC y expresada como μ moles totales acumulados después de 60 min,

disminuyó significativamente en bilis de HP1 (0,06 \pm 0,02) y HP7 (1,12 \pm 0,21) respecto de S (2,12 \pm 0,31), p<0,05 (n=3). HP1 y HP7 difirieron entre sí (p<0,05). La excreción en intestino (perfusión con buffer R-K, 0,2 ml/min) fue mayor en HP1 (0,057 \pm 0,008) respecto de HP7 (0,039 \pm 0,003) y S (0,035 \pm 0,010), p<0,05 (n=3). La excreción renal (orina recogida por punción vesical al final del experimento) no mostró diferencias entre grupos. El contenido tisular de DNP-SG de HP1, evaluado a los 5 min de inyectado CDNB, disminuyó en hígado (-69%) y corteza renal (-51%) mientras que aumento en intestino (+105%) respecto de S (p<0,05, n=4). Los resultados indican una severa alteración de la secreción hepática de DNP-SG sin alteración de expresión de Mrp2. Las determinaciones tisulares sugieren insuficiente metabolización de CDNB, y por tanto disponibilidad, como principal causa de alteración. El intestino podría contribuir, aunque mínimamente, a compensar la deficiencia.

236. (3628) RADICALES LIBRES DEL OXÍGENO (RLO) COMO MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN HEPATOCELULAR: PKC MEDIA LA DESORGANIZACIÓN DE ACTINA INDUCIDA POR TERT-BUTILHIDROPERÓXIDO SIN MODIFICAR LA PRODUCCIÓN DE RLO. PÉREZ, LEONARDO MARTIN; OCHOA, JUSTINA ELENA; SÁNCHEZ POZZI, ENRIQUE JUAN; ROMA, MARCELO GABRIEL

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) - CONICET - UNR

Los RLOs pueden producir efectos deletéreos a nivel celular modulando cascadas de señalización intracelular más que oxidando directamente las estructuras afectadas. Dado que los RLO pueden activar PKC en diferentes tipos celulares, analizamos en hepatocitos aislados de rata si inhibidores de PKC pueden prevenir la desorganización de actina, una manifestación precoz de daño por RLO inducida por el agente pro-oxidante tert-butilhidroperóxido (tBOOH). Para descartar un efecto de PKC a nivel de la producción de RLO, evaluamos además si inhibidores de PKC previenen la formación de los mismos inducida por tBOOH. tBOOH (100 μ M, 15 min) no afectó la viabilidad celular, la liberación de LDH al medio ni los niveles intracelulares de GSH, pero aumentó el % de hepatocitos exhibiendo ampollas de membrana, un marcador precoz de desorganización de actina (68% \pm 4% vs 18% \pm 2%, p<0,001). tBOOH produjo además extensiva redistribución de actina, visualizada por marcado fluorescente con FICT-faloidina seguida de microscopía confocal. Ambos fenómenos fueron completamente prevenidos por los inhibidores de PKC, H7 (100 μ M), estaurosporina (EP, 1 μ M) y Gö6976 (2 μ M), o por dibutiliril-AMPc (0,5 mM), un activador de PKA, enzima capaz de contrarregular PKC. tBOOH incrementó la producción de RLO, medidos espectrofluorométricamente a través de la formación dependiente de RLO del fluorocromo diclorofluoresceína (+37 \pm 4%; p<0,005). Ni los inhibidores de PKC, H7, EP o Gö6976, ni el activador de PKA dibutiliril-AMPc, modificaron la capacidad de tBOOH para producir RLO. Se concluye que los RLO inducen desorganización de actina vía PKC, un fenómeno contrarregulado por PKA. PKC es por lo tanto intermediario en una cascada de señalización iniciada por RLO, confirmando el papel de estos últimos como moléculas de señalización intracelular en el hepatocito.

ENDOCRINOLOGIA Y REPRODUCCION VI

237. (3341) CONTROL HORMONAL DE LAS VARIANTES DE SPLICING DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS BETA (REB) EN EL ÚTERO DE LA RATA. VARAYOUD, JORGELINA; RAMOS, JORGE G.; MONJE, LUCAS; BOSQUIAZZO, VERÓNICA; MUÑOZ DE TORO, MÓNICA; LUQUE, ENRIQUE H.

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormono-dependientes. Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas UNL

Por splicing alternativo se producen isoformas del REb que se traducen en proteínas funcionales: REb 1 y 2, siendo su regulación hormonal desconocida. Estudios in vitro han mostrado que la isoforma b2 incorpora 18 aminoácidos en el dominio de unión a ligando sin modificar el marco abierto de lectura. Esta isoforma posee menor afinidad al E2 y podría tener un efecto represor sobre la expresión de genes estrógeno-dependientes por heterodimerización con el REa y el REb1. Nuestro objetivo fue estudiar los efectos del 17- β estradiol (E2) y la progesterona (Pg) sobre la expresión del REb y sus variantes de splicing en el útero de la rata. Se usaron ratas adultas ciclando y ovariectomizadas (OVX) inyectadas sc con: E2 (0.05 mcg o 5 mcg) y/o Pg (1 mg) durante 4 días. Los úteros fueron extraídos 24 hs después de la última inyección. Por RT-PCR se determinó el ARNm total y las variantes de splicing del REb. Durante las distintas fases del ciclo estral se detectaron ambas isoformas y los niveles de ARNm total no sufrieron cambios cuantitativos. En las ratas OVX los niveles de ARNm total fueron muy bajos, presentando solamente la isoforma b1. Los animales OVX tratados con ambas dosis de E2 presentaron un significativo aumento en la expresión de ARNm total a expensas únicamente de la isoforma b1, mientras que la Pg aumentó el ARNm total aumentando la expresión de b1 y b2. Los animales tratados con E2+Pg presentaron un aumento en ambas isoformas comparados con los OVX no tratados. Estos resultados demuestran que en el útero de la rata se expresan ambas isoformas de splicing del REb y que son reguladas diferencialmente por E2 y Pg. La Pg induce la isoforma inhibidora b2, sugiriendo una nueva vía de modulación de esta hormona sobre la acción estrogénica en el útero.

- 238. (3347) VITELOGENINA COMO BIOMARCADOR DE CONTAMINACIÓN POR XENOESTRÓGENOS: PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO PARA DETECCIÓN DE VITELOGENINA DE YACARÉ OVERO (CAIMAN LATIROSTRIS).** REY, FLORENCIA; RAMOS, JORGE G.; STOKER, CORA; RODRÍGUEZ, HORACIO; BUSSMANN, LEONARDO; LUQUE, ENRIQUE H.; MUÑOZ DE TORO, MÓNICA

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormono-dependientes, Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas UNL Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Buenos Aires

Los xenoestrógenos pueden interferir con la homeostasis del sistema endocrino. Tanto la actividad agroindustrial como los desechos urbanos generan xenoestrógenos que contaminan el ambiente. El desarrollo de metodologías para evaluar contaminación de los sistemas hídricos y la caracterización de especies centinelas para detectar exposición a xenoestrógenos, son de fundamental importancia. La vitelogenina (Vtg) es una fosfoglicolipoproteína producida en el hígado de especies ovíparas en respuesta a estrógenos. Resultados previos indican que machos de Caiman latirostris sintetizan Vtg en respuesta a bajas dosis de 17 β -estradiol (E2). Nuestro objetivo fue desarrollar un método de detección de Vtg de yacarés y profundizar la caracterización de esta especie como centinela de contaminación por xenoestrógenos. Obtuvimos Vtg de plasma de hembras expuestas a altas dosis de E2. La Vtg se identificó en geles de poliacrilamida por tinción con Coomassie blue y Stains all y se purificó por precipitación con MgCl₂ seguida por cromatografía de intercambio iónico. La fracción purificada se sembró en geles de poliacrilamida y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Para la producción del anticuerpo anti-Vtg se inocularon conejos con la fracción de nitrocelulosa pulverizada. En Western blot y utilizando estándar purificado, el anticuerpo generado mostró alta sensibilidad detectando Vtg en el orden de 0.01 μ g y alta linealidad (0 a 0.64 μ g de Vtg, r(2): 0.918). Usando plasmas de yacarés machos y hembras en condiciones basales y postestimulación con E2, el anticuerpo mostró alta especificidad. El anticuerpo obtenido resulta adecuado para evaluar cuantitativamente bajos niveles circulantes de Vtg, permitiendo profundizar la caracterización de Caiman latirostris como centinela de contaminación por xenoestrógenos.

- 239. (3358) EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL XENOESTRÓGENO BISFENOL A SOBRE EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.** DURANDO, MILENA; KASS, LAURA; LUQUE, ENRIQUE H.; MUÑOZ-DE-TORO, MÓNICA

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormono-dependientes- Fac de Bioquímica y Cs Biológicas- UNL

Complejas interacciones estroma-epitelio gobiernan el desarrollo y funcionalidad de la glándula mamaria (GM). Asociados a lesiones preneoplásicas se han descrito mastocitos. La mayor incidencia de cáncer de mama en las últimas décadas coincide con la introducción de químicos estrogénicos al ambiente. El bisfenol A (BPA) es un xenoestrógeno utilizado en la manufactura de plásticos, resinas epoxi y selladores dentales. Nuestra hipótesis supone que la exposición a BPA, durante la organogénesis favorece la mayor incidencia de cáncer de mama. Ratas Wistar recibieron desde el día 8 de gestación y hasta el final: vehículo (v) o BPA (25 y 250 μ g/kg/día). Las crías hembras se sacrificaron a los 50 (50d), 110 y 180 días de edad, previa inyección con BrdU. Se evaluó proliferación celular, apoptosis e infiltración de mastocitos. Se cuantificó densidad de núcleos del estroma y proliferaciones intraductales (PIDs). El tratamiento con BPA aumenta la relación proliferación/apoptosis en parénquima y estroma a los 50d. También, la infiltración de mastocitos es mayor a los 110d (v 0,2 \pm 0,01 vs 25BPA 0,4 \pm 0,04 y 250BPA 0,3 \pm 0,03) y 180d (v 0,2 \pm 0,02 vs 25BPA 0,5 \pm 0,07). La densidad de núcleos del estroma a los 180d es mayor en animales con BPA (v 41,7 \pm 4,9 vs 25BPA 90,2 \pm 8,6 y 250BPA 77,4 \pm 4,1). El porcentaje de PIDs fue mayor para ambas dosis de BPA a los 110d (v 7,0 \pm 1,2 vs 25BPA 18,0 \pm 3,2 y 250BPA 17,7 \pm 5,3) y 180d (v 2,3 \pm 0,7 vs 25BPA 16,2 \pm 2,3 y 250BPA 13,2 \pm 2,9). Demostramos que la exposición in utero a BPA induce cambios en el turnover celular de la GM y en la cinética de infiltración de mastocitos que podrían ser los responsables del significativo incremento de las PIDs. Se sugiere que una alteración en la relación estroma-epitelio en respuesta al BPA podría explicar los resultados obtenidos.

- 240. (3403) ROL MODULATORIO DEL MEDIO ENDÓGENO ESTROGÉNICO SOBRE LA ACTIVIDAD NEUROINMUNOENDOCRINA-ADIPOCITARIA.** PERELLO, MARIO; GIOVAMBATTISTA, ANDRES; SPINEDI, EDUARDO

Unidad de Neuroendocrinología. IMBICE (CONICET-CICPBA), La Plata. Unidad de Neuroendocrinología. IMBICE (CONICET-CICPBA), La Plata.

Los estrógenos (E) modulan las funciones neuroinmunoendocrina y adipocitaria; sobre la última, no sólo influyen la distribución grasa corporal, además, regulan la adipogénesis y la expresión de leptina. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de E circulante sobre la respuesta neuroinmunoendocrina-adipocitaria durante el shock endotóxico. Se utilizaron ratones BALB/c ovariectomizados (OVX) y SHAM. 21 días post-cirugía, los animales se sacrificaron antes o a 30, 60, 90 y 120 min post-endotoxina (LPS; ip, 25 μ g/ratón). Se dosó ACTH, corticosterona (B), TNF y leptina circulante. Animales adicionales se utilizaron para evaluar in vitro la liberación adipocitaria de leptina en respuesta a Insulina (0,5 nM). Resultados: La OVX no modificó los parámetros evaluados en la situación basal. En respuesta al LPS, el incremento de ACTH fue superior (P<0,05) en los animales OVX que en los SHAM a partir de los 60 min. (a 120 min. post-LPS: SHAM=633,7 \pm 43,1 vs. OVX=1071,3 \pm 43,3 pg/ml), aunque el incremento de B fue inferior (P<0,05) en los OVX (a 120 min. post-LPS: SHAM=75,0 \pm 4,0 vs. OVX=47,4 \pm 6,6 μ g/dl); TNF incrementó en ambos grupos post-LPS, siendo mayor (P<0,05) en animales OVX que en SHAM; y leptina sólo incrementó en SHAM a 120 min post-LPS (SHAM=3,56 \pm 0,48 vs. OVX=1,82 \pm 0,29 ng/ml). Estudios in vitro indican que: 1) adipocitos de OVX liberan espontáneamente menor (P<0,05) leptina que los de SHAM (SHAM=0,24 \pm 0,05 vs. OVX=0,12 \pm 0,02 ng/ml de medio) y 2) insulina incrementa (P<0,05) la secreción de leptina en SHAM (0,46 \pm 0,02 ng/ml de medio) y no en OVX

(0,18±0,02 ng/ml de medio). Concluimos que la falta prolongada de E circulantes aumenta la respuesta hipotálamo-hipofisaria a LPS y disminuye la actividad adipocitaria, tanto in vivo como in vitro. (PICT 5191/99)

241. (3480) RELACIONES BIOMECÁNICAS MUSCULOESQUELÉTICAS EN RATAS OVARECTOMIZADAS (OX) TRATADAS O NO CON HORMONA DE CRECIMIENTO RECOMBINANTE HUMANA (RHGH). CAPOZZA, RICARDO; FELDMAN, SARA; REINA, PAOLA; FRACALOSI, NÉSTOR M.; FERRETTI, JOSÉ LUIS; COINTRY, GUSTAVO

Centro de Estudios de Metabolismo Fosfocálcico (CEMFOC) Cátedra de Química Biológica, y CEMFOC, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, Rosario

Para analizar sus efectos músculoesqueléticos se inyectó rhGH (150 UI/kg/d x 3 meses) a ratas de 3 meses enteras u OX. Sus fémures se escanearon tomográficamente (pQCT) al centro y se testaron en flexión, y se pesaron sus músculos gastrocnemios. La OX redujo la densidad mineral y la rigidez (módulo elástico E) del tejido cortical ($p < 0.05$), sobrecompensando ese efecto por un ensanchamiento óseo (diámetros, momento de inercia -MI-; ANOVA, $p < 0.001$). La dosis ensayada de rhGH tuvo poco efecto sobre la rata intacta, pero previno el deterioro de la mineralización (no de la rigidez) del material en la OX, incrementando aditivamente el MI diafisario (ANOVA, $p < 0.01$) y la carga de fractura (ANOVA, $p < 0.01$). La combinación de los efectos de OX y rhGH sobre indicadores de la calidad material y arquitectónica ósea (MI vs E; curvas de "distribución/calidad"; ANCOVA, $p < 0.01$ siempre) sugirió un desplazamiento "anabólico" del setpoint del mecanostato óseo, con repercusión positiva sobre la carga de fractura diafisaria (ANOVA, $p < 0.01$). Los efectos de OX, y de rhGH sobre OX, fueron correlativos con aumentos aditivos de la masa muscular ($p < 0.01$ siempre); pero la repercusión de la mejora muscular fue más evidente sobre la arquitectura ósea (MI, $p < 0.01$) que sobre la resistencia a la fractura ($p > 0.05$). Esta aparente incongruencia se explica por la reducción de la calidad del material (E), que la OX indujo y la rhGH no previno, tal vez por no actuar sobre la microestructura del material mineralizado. Estas evidencias 1. apoyan la indicabilidad de la rhGH para mejorar osteopenias post-menopáusicas con deterioro estructural importante, pero la relativizan en tanto se desconoce la naturaleza de sus efectos (o de su falta de efecto) sobre la calidad mecánica del material duro afectada por la carencia estrogénica, y 2. desafían la hipótesis de normalidad del material remanente en las osteopenias metabólicas en general, en forma original.

242. (3964) EFECTO AGUDO DE UN AGONISTA DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GNRH) EN LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEINA REGULADORA DE LA ESTEROIDOGÉNESIS AGUDA (STAR) EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE RATA. IRUSTA, GRISELDA; PARBORELL, FERNANDA; GONZALEZ, OLGA; ABRAMOVICH, DALHIA; TESONE, MARTA

Instituto de Biología Y Medicina Experimental (IBYME) Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad de Buenos Aires.

Objetivos: Evaluar el efecto in vivo de un agonista de GnRH (Acetato de Leuprolide, LA) sobre la expresión de la Proteína Reguladora de la Esteroidogénesis Aguda (StAR) en folículos ováricos. Material y Métodos: Ratas prepúberes tratadas con PMSG (grupo control) o PMSG+LA (grupo LA) se sacrificaron a distintos tiempos (2 y 8 hs). Se aislaron los folículos por microdissección, se realizaron extractos proteicos y se observó la expresión de la proteína StAR. Resultados: Como ha sido demostrado anteriormente, se observa un aumento de la proteína luego de 8 hs de administrado el análogo. Sin embargo no se han hallado diferencias significativas, dentro o entre tratamientos, a tiem-

pos más prolongados. Además, se realizaron cortes histológicos de ovarios para inmunohistoquímica de StAR. En folículos preantrales, no se observó expresión luego de las 2 hs de la administración de PMSG. En cambio, en el grupo LA, se puede observar un aumento en el % de folículos positivos, el cual es más notorio en células de la teca. Resultados similares se observan a las 8 hs de tratamiento. Sin embargo, existe señal, en el grupo control para esta proteína en teca. En folículos antrales, no se observa expresión para StAR en células de la granulosa, dentro del grupo control pero en el grupo LA se puede ver un leve aumento en la expresión StAR luego de las 8hs de tratamiento. En las células tecales, hay un aumento en la expresión de StAR a las 8hs en el grupo control y un aumento más pronunciado en el grupo LA en este mismo tiempo. Estos datos se corroboran con los resultados obtenidos previamente por western blot y RT-PCR. Conclusión: El agonista de GnRH (LA) actuaría en forma aguda sobre la esteroidogénesis ovárica, aumentando la expresión de la proteína StAR en las células de la teca.

ENDOCRINOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN VII

244. (3321) MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE REALFA, REBETA, RP Y DE LA VARIANTE REBETA2 SE ASOCIAN A CAMBIOS EN LA PROLIFERACIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATAS MULTÍPARAS. KASS, LAURA; DURANDO, MILENA; RAMOS, JORGE G; LUQUE, ENRIQUE H; MUÑOZ-DE-TORO, MÓNICA

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH), Facultad de Bioq y Cs Biol, UNL

En ratas multíparas se ha observado una disminución en la actividad proliferativa y mayor diferenciación del epitelio mamario. Nuestro objetivo fue caracterizar las modificaciones que ocurren en la glándula mamaria como consecuencia de sucesivas gestaciones e investigar posibles mecanismos de regulación. El día 9 de la primera (núlpara, N), segunda (primípara, P) o tercera (múltipara, M) gestación se obtuvieron muestras de sangre y de glándula mamaria (previa administración de BrdU). Por inmunohistoquímica se cuantificó: incorporación de BrdU, expresión de alfa-lactoalbúmina, REalfa, REbeta, RP y alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA). Por RT-PCR se midió ARNm de Wnt-4 y REbeta2 y por RIA los perfiles hormonales. No observamos diferencias en los niveles circulantes de E2, P4, PRL, GH e IGF-I. En M, las células luminarias exhibieron mayor expresión de alfa-lactoalbúmina (M 0.62±0.01 vs N 0.4±0.01 y P 0.3±0.03), REalfa (M 28.6±1.9 vs N 17.7±1.1 y P 19.3±1.2), REbeta (M 31.5±2.0 vs N 16.9±1.5 y P 12.2±1.3) y del ARNm del REbeta2 (M 12.8±3 vs N 4.6±1.5 y P 2.9±1.6); mientras que la proliferación celular (M 9.5±1 vs N 21.3±1 y P 18.9±0.8) y la expresión del RP (M 14.1±1.5 vs N 20.3±1.4 y P 18.0±1) fueron menores. No hubo cambios a nivel del ARNm del Wnt-4. La diferenciación de las células mioepiteliales (evaluada por expresión de alfa-SMA) es gradual (N 47.6±2.7 vs P 64.7±6.2 vs M 81.2±1.6). Ninguno de los parámetros analizados muestra diferencias entre N y P, las diferencias se observan en las M. Con un medio endocrino similar, cambios a nivel de la expresión de los receptores modificarían la respuesta biológica a las hormonas. La sobre-expresión de REbeta2 (variante que antagoniza los efectos mediados por REalfa) explicaría la menor proliferación y menor expresión del RP observada en las ratas multíparas.

245. (3338) EFECTO DEL 17-BETA ESTRADIOL (E2) Y LA PROGESTERONA (PG) SOBRE EL SPLICING ALTERNATIVO DEL ARNm DE RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA EN EL ÚTERO. RAMOS, JORGE GUILLERMO; VARAYOUD, JORGELINA; MONJE, LUCAS; BOSQUIAZZO, VERÓNICA; MUÑOZ DE TORO, MÓNICA; LUQUE, ENRIQUE H.

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes. Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas UNL

El ARNm del receptor de estrógeno alfa (REa) presenta isoformas debidas a splicing alternativo. Se ha observado que dichas isoformas se traducen en proteínas funcionales con diferente capacidad de transactivación. El objetivo fue estudiar los efectos del E2 y la Pg sobre el control del splicing alternativo del REa en el útero de la rata. Se usaron ratas adultas intactas y ovariectomizadas (OVX) inyectadas sc con E2 (0.05mcg o 5mcg) y/o Pg (1mg) durante 4 días. Los úteros fueron extraídos 24 hs posteriores a la última inyección. Por RT-PCR se determinó el ARNm total y se identificaron las variantes de splicing: FL (Full Length), S3, S4 y S3-4. Durante el ciclo estral se detectó la expresión de todas las variantes de splicing estudiadas. Una menor expresión de S3 se observó en diestro, mientras que en proestro y estro no hubo cambios en los niveles de expresión relativos. En los animales OVX la dosis alta de E2 (5mcg) y la de Pg produjeron una disminución en la expresión del ARNm total de ERa comparado con los controles OVX más vehículo. Con relación a las isoformas, la dosis alta de E2 (5mcg) disminuyó todas las variantes estudiadas, mientras que la baja (0.05mcg) reguló hacia abajo únicamente la isoforma S3. Esto último también ocurre cuando los animales OVX recibieron sólo Pg. Las ratas tratadas con E2+Pg no presentaron variaciones en la expresión del ARNm total del REa, sin embargo hubo una disminución relativa en la expresión de la isoforma S3. Estos resultados muestran que el splicing alternativo del REa en el útero de la rata es regulado por el E2 y la Pg. Esto permitiría modular la respuesta estrogénica en el útero, regulando la expresión relativa de moléculas receptoras con diferentes capacidades transactivacionales de genes estrógeno dependientes.

246. (3364) ONTOGENIA DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P27 EN LA PRÓSTATA VENTRAL DE RATA. RODRIGUEZ, HORACIO A.; RAMOS, GUILLERMO; DURANDO, MILENA; VARAYOUD, JORGELINA; MUÑOZ DE TORO, MÓNICA; LUQUE, ENRIQUE H.

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH) Fac de Bioqca y Cs Biológicas UNL

La proteína p27 es un inhibidor de la proliferación celular con actividad de quinasa dependiente de ciclina, que interviene en el control de la proliferación celular en el epitelio prostático. Nuestro objetivo fue conocer la ontogenia de la expresión de p27 con relación a la proliferación celular y a la expresión del receptor de andrógeno (AR) en la próstata. Se usaron próstatas ventrales de ratas de 5 días de edad (D5), D15 y D30. Por inmunohistoquímica se determinó incorporación de bromodeoxyuridina como marcador de proliferación celular, expresión de AR (% de células positivas) y de p27 (HistoScore, HS: combinación lineal entre área ocupada por núcleos positivos y la densidad óptica). No hubo diferencias en la expresión de AR epitelial entre los días estudiados. Sin embargo, los animales de D5 presentaron un bajo HS de células epiteliales para p27 (0.64±0.07) mientras que en D15 y D30 presentaron valores significativamente superiores (D15: 1.65±0.29; D30: 2.13±0.37). La proliferación celular epitelial presentó un patrón inverso al de p27: altos porcentajes en D5 (24.90±4.60) que disminuyeron en D15 y D30 (D15: 19.63±4.3; D30: 15.85±1.70). Una correlación negativa se observó entre p27 y la proliferación celular ($r^2 = 0.72$; $p < 0.01$) en las células epiteliales. En el estroma periductal p27 y AR no presentaron diferencias, mientras que la proliferación estromal mostró un patrón similar al epitelial, siendo máxima en D5. Los resultados demuestran que la p27 se expresa en etapas tempranas del desarrollo prostático, que no se asocia con el AR ni con la proliferación celular del estroma pero tiene correlación inversa con la proliferación epitelial. Se sugiere que la p27 intervendría en el control de la proliferación celular epitelial de la próstata durante su ontogenia.

247. (3792) MODULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y EL CATABOLISMO DE LA PROSTAGLANDINA (PG) F2A UTERINA POR PROGESTERONA DURANTE LA PREÑEZ EN LA RATA. FARINA, MARIANA; WEISSMANN, CARINA; RIBEIRO, M.LAURA; FRANCHI, ANA M.

CEFyBO- CONICET Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)

La quiescencia uterina es un requisito indispensable para el éxito de la gestación. Las PGs aumentan la contractilidad uterina necesaria para el progreso del parto. Las ciclooxigenasas (COX) y la 15 hidroxi prostaglandina dehidrogenasa (PGDH), son las enzimas responsables de su síntesis y catabolismo. En algunos tejidos se observa una correlación entre la actividad de la PGDH y los niveles de progesterona (P4). Por ello, nuestro objetivo fue investigar la influencia de la P4 sobre la síntesis y el catabolismo de la PGF2a uterina. Se utilizaron ratas preñadas en día 5-13-21-22, no preñadas y 24 hs post parto. Para evaluar la actividad de la PGDH analizamos la relación PGFM (metabolito de la PGF2a)/PGF2a. Resultados: La P4 sérica (RIA) se encuentra elevada durante la preñez y decrece hacia el momento del parto. Los niveles de PGF2a (RIA) son mínimos a mitad de la preñez y aumentan antes del inicio del parto. La expresión de las COXs (Western Blot) acompaña el perfil de síntesis de PGF2a. El tratamiento con P4 al final de la gestación (8mg/kg/12hs) previene el incremento en los niveles de PGF2a (C:11,5±1,7 vs P4:4,1±0,7 ng/mg prot, $p < 0.001$). En concordancia, la administración de RU-486 (antiprogéstágeno, 10mg/kg) en el día 12, incrementa la síntesis de PGF2a uterina (C:1,6±0,1 vs RU-486:4,4 ±0,3, $p < 0.05$). El tratamiento con P4 previene el incremento en los niveles proteicos de ambas isoformas mientras que la administración de RU-486 induce un aumento en el de COX-2 no afectando la expresión de COX-1. La relación PGFM/PGF2a se encuentra elevada el día 13 decreciendo hacia el momento del parto. La P4 incrementa, mientras que el RU-486 disminuye esta relación. Estos resultados sugieren que la progesterona es capaz de regular la síntesis y el catabolismo de la PGF2a uterina.

248. (3959) INDUCCION DE PROSTAGLANDINAS OVARICAS POR ADMINISTRACION DE UN ANALOGO DE GNRH Y SU RELACION CON EL SISTEMA OXIDO NITRICO. IRUSTA, GRISELDA; LUCHETTI, CAROLINA G; TESONE, MARTA; MOTTA, ALICIA B

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)

En el tejido ovárico se han identificado péptidos homólogos a la hormona hipotalámica GnRH, como también la expresión de sus receptores. Se ha demostrado que GnRH y sus agonistas actúan en tejidos extrahipofisarios. El objetivo fue estudiar el efecto in vivo de un agonista de GnRH (acetato de leuprolide: LA) sobre el desarrollo de folículos ováricos. Se utilizaron dos modelos experimentales: 1.- ratas prepúberes tratadas con 25 UI de PMSG (s.c., 48 h: grupo control) y PMSG + LA (s.c., 1 ug/rata por día cada 12 h durante 48 h: grupo LA). Los animales fueron sacrificados a las 3 h luego de la última inyección de LA y 2.- ratas prepúberes fueron tratadas subcutáneamente con 25 UI de PMSG. A las 12 h a los animales del grupo LA se les inyectó el análogo (1 ug/rata) intrabursa ovárica y fueron sacrificados 5 h luego de la operación. En el tejido ovárico se determinaron por radioinmunoensayo los niveles de prostaglandinas (PGs): E y F2a y se evaluó la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) mediante la conversión de 14 C-arginina a 14 C-citrulina. Se observó un aumento de PGF2a en ambos modelos luego de la administración de LA (control= 4+1 vs LA=34+4 ng/folículo; control= 71+5 vs LA=355+60 pg/mg tejido). Sin embargo se observó que el análogo administrado en forma subcutánea produjo una disminución de la PGE ovárica (control=47+2 vs LA=29+3 ng/folículo) mientras que el mismo localmente aumentó los niveles de este prostanoides (control=93+20 vs LA=1882+300pg/mg tejido). Paralelamente, la actividad de la NOS no se vio modificada en ninguno de los grupos experimentales. Podemos concluir que existiría un efecto local de GnRH en el ovario modulando la producción tanto de PGE como de PGF2a. Asimismo esta variación no estaría mediada por el sistema óxido nítrico.

249. (4029) TRANSPORTE DE UREA EN PLACENTA HUMANA NORMAL Y PREECLÁMPTICA. DAMIANO, A E^{1,2}; ZOTTA, E²; GODOY, S^{1,2}; IBARRA, C^{1,2}

¹Lab. Canales Iónicos, Fac. Farmacia y Bioquímica ²Lab. Fisiopatología, Depto de Fisiología, Fac. Medicina, UBA.

El normal desarrollo y crecimiento del feto depende del transporte adecuado de nutriente, iones y agua a través de la placenta. Como el sincitiotrofoblasto de placenta humana (SCT) presenta escasas uniones estrechas, el intercambio de solutos entre la madre y el feto tiene lugar por la vía transcelular. Sin embargo, poros paracelulares inespecíficos podrían también permitir la transferencia de grandes moléculas hidrofílicas. Previamente, informamos la expresión de acuagliceroporinas (AQPs) tipo 3, 7 y 9 en la membrana apical y basal de SCT. Estas AQPs transportan agua, urea y glicerol y su expresión se altera en placentas preeclámpticas. Recientemente, detectamos la expresión de un transportador de urea tipo UT-A por técnicas de RT-PCR y Western blot en SCT. La localización en la membrana apical fue confirmada por inmunohistoquímica, mostrando una mayor expresión en placentas de primer trimestre y en placentas preeclámpticas. La caracterización del transporte de urea se realizó en cultivo de explantos mediante técnicas radioisotópicas. La incorporación de ¹⁴C-urea en placenta normal fue de $16,0 \pm 0,5$ pmol.min⁻¹.g⁻¹ explanto. En presencia de HgCl₂ (0.3 mM) fue de $8,0 \pm 0,5$ pmol.min⁻¹.g⁻¹ explanto, mientras que en explantos incubados previamente con fletina (0.5 mM) fue de $10,3 \pm 0,3$ pmol.min⁻¹.g⁻¹ explanto. En placenta preeclámptica, la inhibición de la incorporación de urea por fletina fue significativamente mayor que en las normales (59%, $P < 0,05$) pero no se inhibió con HgCl₂. Esto sugiere que el movimiento de urea a través de las vellosidades coriónicas normales podría ocurrir a través de AQPs sensibles a HgCl₂ y de UT-A sensible a fletina, mientras que en preeclampsia este transporte se efectuaría mediante UT-A.

INMUNOLOGIA VI

250. (3296) MODULACIÓN DE ARTRITIS EXPERIMENTAL POR COADMINISTRACIÓN DE COLÁGENO TIPO II (CII) Y QUITOSANO. PORPORATTO, CARINA; RIERA, CLELIA MARÍA; CORREA, SILVIA GRACIELA

Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNCórdoba Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNCórdoba.

El polisacárido quitosano facilita la absorción de antígenos a través de la mucosa y favorece la permanencia de los mismos en los sitios de inducción de la respuesta inmune. Estudiamos el efecto tolerogénico de la coadministración de colágeno (CII) y quitosano en el desarrollo de artritis experimental. Ratas Wistar recibieron en 5 días consecutivos 1 mg de CII o 1 mg de CII + 1 mg de quitosano (C:Q); como controles se incluyeron animales que recibieron diluyente (D) o 1 mg de quitosano (Q). Todos los grupos se inmunizaron con CII-CFA al día 7. Se evaluó la incidencia, la aparición de la enfermedad, y las manifestaciones clínicas de la artritis, la respuesta de LT, los niveles de anticuerpos anti-CII (ELISA), el número de células productoras de anticuerpos anti-CII (CELL-ELISA) y la producción de IL-10 intracelular por linfocitos CD3+ (citometría de flujo). Los síntomas clínicos de la enfermedad se manifestaron a los 13-15 días en todos los grupos. El grupo CII:Q presentó la menor incidencia de la enfermedad ($p < 0,05$) y la severidad de los animales enfermos fue menor comparada con el grupo CII a lo largo de 2 semanas de observación. La respuesta de LT estuvo disminuida en los grupos CII y C:Q ($p < 0,05$ vs. controles) en tanto que el número de células productoras de anticuerpos fue similar en todos los grupos. En animales enfermos y sanos de todos los grupos hubo niveles similares de IgA anti-CII en tanto que la IgG anti-CII estuvo significativamente incrementada en animales enfermos del gru-

po CII ($p < 0,001$) y en animales sanos del grupo Q ($p < 0,001$). Estos resultados muestran que el polisacárido quitosano administrado por vía oral promueve la inducción de tolerancia y modula la respuesta inmune contra CII, favoreciendo manifestaciones clínicas menos severas.

251. (3459) EXPRESION EPITELIAL DE L-FUCOSA EN SITIOS INMUNO-INDUCTORES DEL TRACTO DIGESTIVO DE CONEJO. ROMA, STELLA; BARBEITO, CLAUDIO; PÉREZ, FERNANDO; GIMENO, EDUARDO; DLUGOVITZKY, DIANA

Facultad de Ciencias Médicas. UNR Cát.Histología - Cát.Microbiología. Fac. Medicina. UNR. Instituto de Patología. Fac.Veterinaria. UNLP

En conejo, el apéndice cecal, placas de Peyer, ciego y saco redondo son sitios inmuno- inductores del tubo digestivo, que transportan y presentan antígenos a las células linfoides, para mantenerlas activadas. Para facilitar la adhesividad y el ulterior pasaje de macromoléculas, las células del FAE (epitelio asociado a folículos) muestran un contenido glucídico diferencial. Varios trabajos destacan la presencia, en condiciones normales, de L-fucosa en el FAE, detectable con la lectina Ulex Europaeus I (UEI); mas no se han reportado datos sobre los glucoconjugados del FAE ante cambios en el estado inmunológico del animal. El objetivo fue determinar si la sensibilización subcutánea y el desafío por vía oral con Ovoalbúmina (OVA) inducen modificaciones cualitativas en las células del FAE positivas al UEI. Cuarenta conejos Neocelandeses adultos se dividieron en: Grupo (G)1: control. G2: sensibilizados con OVA. G3: no sensibilizados y desafiados. G4: sensibilizados y desafiados con OVA. Muestras de los cuatro órganos se incluyeron en parafina y se incubaron con UEI. La sensibilización se evaluó con el test de anafilaxia cutánea pasiva positivo en 160 diluciones. En apéndice y saco redondo de todos los grupos, se observó intensa positividad al UEI, a nivel de las células del FAE ubicadas en las zonas laterales del domo. En placas cecales y de Peyer se evidenció reactividad inconstante y heterogénea al UEI. La L-fucosa detectada diferencialmente en el FAE, facilitaría la adhesión antigénica a estas células. En estudios anteriores se demostró que la sensibilización y el desafío modifican el número de células del FAE. Sin embargo éstas conservan el patrón diferencial de glicosilación, como el hallado en los animales normales. En placa cecal y placa de Peyer, el FAE se encuentra en íntimo contacto con el contenido luminal, mientras que en saco redondo y apéndice cecal se interponen los tejidos de la vellosidad. Esto podría explicar la diferente reactividad al UEI hallada en estos órganos.

252. (3501) INTERACCIÓN ENTRE GLUCOCORTICOIDES (GC), CITOQUINAS DIFERENCIADORAS Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (FT) INVOLUCRADOS EN LA ADQUISICIÓN DEL LINAJE DEL LINFOCITO T DE AYUDA. LIBERMAN, ANA CLARA; REFOJO, DAMIÁN; ARZT, EDUARDO

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA, Argentina CONICET

Estudiamos la regulación por GC de T-bet y GATA-3 dos FT claves para la diferenciación Th1 y Th2 respectivamente. Demostramos, en ensayos de transfección transiente en la línea celular EL-4, que los GC inhiben la actividad del promotor de GATA-3 inducida por PMA+Ionomicina+AMPc (PIA). Asimismo, demostramos que los GC inhiben la actividad del promotor de IL-5, (una citoquina Th2 sensible a GATA-3) inducida por PIA y por expresión de GATA-3 exógeno. Observamos que la sobreexpresión de GATA-3 revierte casi en un 100% el efecto inhibitorio de los GC sobre el promotor de IL-5 y que los GC inhiben la acción de GATA-3 sobre sus elementos respondedores. Los GC inhiben fuertemente la actividad de T-bet sobre el promotor de la citoquina Th1 IFN-gamma. El efecto inhibitorio de los GC sobre la actividad de T-bet es más potente que el observado sobre la actividad de

GATA-3. La sobreexpresión de T-bet revierte significativamente esta inhibición. En un marco fisiológico demostramos, por ensayos de Northern blot en cultivos primarios de esplenocitos de ratón, que los GC inhiben la inducción del mRNA tanto de GATA-3 como de T-bet y que esta inhibición es revertida por las citoquinas IL-4 e IL-12 respectivamente. Conclusiones: Los GC actúan inhibiendo tanto la inducción como la actividad de GATA-3 y de T-bet sobre sus genes blanco, en el caso de GATA-3 sobre sus elementos respondedores. T-bet es un FT fuertemente sensible a la inhibición por GC favoreciendo un switch hacia la diferenciación Th2.

253. (3689) PRESENCIA Y FENOTIPO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DURANTE LA GESTACIÓN MURINA. ROL EN LA MANTENCIÓN DE LA PREÑEZ? BLOIS, SANDRA M.; ALBA SOTO, CATALINA; TOMETTEN, MAREIKE; CLARK, DAVID A.; MARGNI, RICARDO A.; ARCK, PETRA C

Charité, Biomedizinisches Forschungszentrum, Raum 2.0549

Las células dendríticas (CD) son conocidas por su capacidad para inducir respuesta inmune primaria. Actualmente, se reconoce también su importancia en la inducción de tolerancia inmunológica y en la regulación de la respuesta inmune mediada por células T. Recientemente, las CD han sido descripta en la decidua en humanos, sin embargo su función y su rol durante la gestación no ha sido aclarado. El objetivo del presente estudio fue investigar la cinética y el fenotipo de las CD durante la gestación murina. Luego de la cohabitación de hembras CBA/J con machos DBA/2J, las hembras con tapón vaginal fueron separadas y sacrificadas a los 1.5, 3.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 10.5 13.5, 15.5 o 17.5 días de gestación (dg). En células aisladas de útero se evaluó la frecuencia de CD11c+ marcador de (CD) y fenotipo (coexpresión de CD8a and MHC clase II) así como la expresión de citoquinas intracelulares IL -12, IL-10 por citometría de flujo. El número relativo de células CD11c+ en útero (CD) aumentó significativamente a partir del dg 5.5, alcanzando una meseta desde el dg 9.5 al 17.5. La mayoría de las CD uterinas pertenece al linaje mielode (CD11c+/CD8a-), pero se observó un aumento transitorio en el porcentaje de CD linfoides (CD11c+/CD8a+) entre los dg 1.5 y 5.5. Las CD mostraron una expresión espontánea de IL-10 mayor que la de IL-12 excepto en el dg 5.5. En útero, menos del 30% de las CD expresan de MHC clase II. Sin embargo, este porcentaje disminuyó entre los dg 5.5 y 8.5. Las variaciones en el número y linaje de CD residentes, los cambios en la expresión de IL-10 e IL-12 así como de MHC clase II, que se correlacionan con fases decisivas de el embarazo (p.ej. periodo de peri-implantación), sugieren que estas células poseen un papel en la tolerancia materno al feto.

254. (3694) INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA TH2 ESPECÍFICA EN RATONES BALB/C COMO MODELO MURINO DE REACCIONES ALÉRGICAS. REY, AMANDA; DOCENA, GUILLERMO; FOSSATI, CARLOS ALBERTO

Catedra de Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata

El desarrollo de un modelo murino de alergia alimentaria constituye una herramienta esencial para estudios básicos de la patología. El principal escollo consiste en revertir la tolerancia innata desarrollada por los ratones. El objetivo consiste en inducir una intolerancia alimentaria mediante la aplicación de diferentes planes de inmunización. Fueron empleados ratones BALB/c, diferentes inmunógenos (OVA, leche bovina-LB), adyuvantes (Freund, hidróxido de aluminio, toxina colérica) y vías de sensibilización (intra-peritoneal e intragástrica). Se midieron anticuerpos totales y específicos por métodos in vitro (ELISA y EAST) e in vivo (prueba cutánea-PC- y transferencia cutánea pasiva-TCP), respuesta proliferativa Ag-específica a partir de esplenocitos, aparición de reacciones alérgicas posterior al desafío oral y se realizaron análisis histológicos de distintos órganos. Se detectó un marcado incremento de IgE e IgG1 para proteínas de LB, mientras que IgG2a e IgG2b específicos no aumentaron. Se observaron signos clínicos

desde leves hasta anafilaxia inmediata. Los estudios histológicos mostraron alteraciones en bazo compatibles con una activación inmuno-lógica; se obtuvieron PC y TCP positivas en animales sensibilizados y se obtuvo una marcada respuesta proliferativa Ag-específica. Con OVA no se observaron diferencias al comparar los resultados obtenidos entre los animales sensibilizados y los controles. Los resultados in vivo e in vitro obtenidos en ratones BALB/c indican una activación de mecanismos TH2 frente a proteínas de LB, mientras OVA no induciría un estado de activación inmunológica.

255. (3897) MICA EN LINFOCITOS T ACTIVADOS ¿REGULADOR DE LA HOMEOSTASIS DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA? MOLINERO, LUCIANA LORENA; FUERTES, MERCEDES BEATRIZ; GIRART, MARÍA VICTORIA; FAINBOIM, LEONARDO; ZWIRNER, NORBERTO WALTER

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "Jose de San Martín", UBA Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de Medicina, UBA

Evidencias recientes sugieren que las células NK podrían ejercer citotoxicidad contra linfocitos T activados. Previamente, demostramos por Western Blot y RT-PCR que el ligando de NKG2D, la molécula de histocompatibilidad MICA, se induce en linfocitos T activados. OBJETIVO: investigar la expresión de MICA en superficie de linfocitos T activados y su papel en la citotoxicidad por células NK y células NK activadas por IL-2 (LAK). RESULTADOS: Linfocitos T CD4+ (LT CD4) aislados por selección positiva (pureza > 90%) y activados con PMA e Ionomicina (P+I) mostraron un aumento en la expresión de MICA en superficie por citometría de flujo. Este fenómeno no se observó en LT CD4 presentes en células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) y activadas con P+I, ni aún en presencia de los inhibidores del tráfico intracelular Brefeldina A o citocalasina B. En cambio, la adición de las drogas durante la última hora de activación con P+I inhibió la expresión de MICA en superficie de LT CD4 aislados. Ensayos en transwell mostraron que la expresión de MICA en superficie es inhibida por un factor soluble secretado por CMSPs no adherentes. Esta expresión de MICA en superficie de LT CD4 activados se asoció con la adquisición de susceptibilidad a la lisis por células LAK (ensayos de liberación de 51Cr). LT CD4 activados expresan MICA en superficie, la que es modulada negativamente por un factor soluble secretado por una subpoblación de CMSPs no adherentes. Esta expresión sensibilizaría a los LT CD4 activados a la citólisis por células LAK en forma NKG2D-dependiente, lo que constituye la primera caracterización de una molécula blanco involucrada en la lisis de linfocitos T activados por células LAK, fenómeno que podría ser importante como mecanismo de control de la activación linfocitaria.

256. (3924) LA INHIBICIÓN SELECTIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GALECTINA-1 PROMUEVE EL RECHAZO TUMORAL POR UNA VÍA DEPENDIENTE DE CÉLULAS T E IFN-G EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO. RUBINSTEIN, NATALIA; TOSCANO, MARTA; ILLARREGUI, JUAN MARTÍN; ALVAREZ, MARIANO; ZWIRNER, NORBERTO; FAINBOIM, LEONARDO; PODHAJECR, OSVALDO; RABINOVICH, GABRIEL

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín" Instituto de Investigaciones Bioquímicas, "Luis F. Leloir"

Recientemente demostramos que Galectina-1 (Gal-1) contribuye significativamente al efecto inmunosupresor generado por células de melanoma y promueve el crecimiento tumoral in vivo. El bloqueo de Gal-1, utilizando estrategias antisentido, logró reducir la tumorigenicidad de células de melanoma en ratones singéncicos. El objetivo del presente estudio fue explorar la asociación entre la respuesta anti-tumoral observada y las propie-

dades inmunosupresoras de Gal-1. Utilizando AcMo específicos, eliminamos distintas subpoblaciones linfocitarias previo a la inoculación de los tumores. Células B16 transfectadas con el cDNA de Gal-1 en orientación antisentido (B16/As) fueron capaces de generar tumores en ausencia de linfocitos T CD4 y CD8 con una cinética similar a aquellas células de melanoma transfectadas con el vector control (B16/-). Posteriormente analizamos ex vivo la magnitud y calidad de la respuesta inmune anti-tumoral generada por bloqueo de Gal-1. Linfocitos de ganglios drenantes provenientes de ratones inoculados con B16/As y re-estimulados ex vivo con células B16 produjeron niveles significativamente mayores de IFN- γ (>8000 pg/ml) respecto a aquellos inoculados con B16/- (<500 pg/ml), fenómeno acompañado por un incremento en la proliferación linfocitaria (incorporación de timidina) y reducida susceptibilidad a la apoptosis (anexina V), en comparación con ratones inoculados con B16/-. Estos efectos fueron específicos ya que no se observaron al re-estimar linfocitos ex vivo con el tumor singeneico EL-4. Estos resultados indican que células de melanoma evaden la respuesta anti-tumoral a través de la secreción de Gal-1 y que el bloqueo de su efecto inmunosupresor promueve un potente rechazo tumoral con implicancias en el desarrollo de estrategias de inmunoterapia

257. (3981) ANTICUERPOS ANTI-NUCLEOSOMAS EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES). ASOCIACIÓN CON NEFROPATÍA Y ANTI-ADNn. CASELLAS, ANGELA; GRIMAUDDO, SEBASTIAN; GALARZA, PABLO; MANNI, JORGE

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MEDICAS ALFREDO LANARI Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. UBA

Los anticuerpos anti-nucleosomas estarían involucrados directamente en las alteraciones inmunológicas relevantes para la emergencia clínica del síndrome lúpico. La precisa significación en la patogenia del cuadro general y en especial de la nefropatía no está suficientemente aclarada. Para obtener resultados preliminares fueron cuantificados retrospectivamente los anticuerpos anti-nucleosoma y anti-ADNn en una serie de pacientes con diagnóstico de LES utilizando ELISAs comerciales. Los pacientes tuvieron 4 o más criterios diagnósticos para LES (ACR), 17 no tenían nefropatía (s/NF), otros 15 tenían nefropatía y fueron estudiados en tres momentos distintos: al inicio del compromiso renal (I/NF), un promedio de 10.5 meses antes (pre/NF) y 13.8 meses después (post/NF). Se utilizó el cociente de probabilidad (CP) para estudiar la capacidad predictiva para la nefropatía. Los índices de binding (IB) promedio para anti-nucleosoma en el grupo s/NF vs pre/NF fueron 1.83 y 3.21 respectivamente ($p=0.02$). Para anti-ADNn las UI/ml fueron 688 y 1261 respectivamente ($p=0.31$). Presentaron valores elevados (IB>3) para anti-nucleosoma 2/17 pacientes s/NF y 6/13 pre/NF (11.8% y 46.2% respectivamente; $p=0.04$; CP=3.9). Valores elevados (>300 UI/ml) para anti-ADNn en 4/17 pacientes s/NF y 8/13 pre/NF (23.5% y 61.5% respectivamente; $p=0.04$; CP=2.6). Los valores elevados simultáneos de ambos autoanticuerpos fueron: s/NF 1/17 y pre/NF 5/13 (5.9% y 38.5% respectivamente; $p=0.04$; CP=6.5). En esta serie de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico, los resultados revelan una relación significativa y directa de los anticuerpos anti-nucleosoma y anti-ADNn con la presencia de nefropatía. Estos datos sugieren la ventaja de utilizar ambos ensayos para definir la probabilidad que tendrían los pacientes con LES de desarrollar compromiso renal.

NEUROCIENCIAS III

258. (3452) POLISOMNOGRAFIA Y NIVELES DE MELATONINA EN PACIENTES PORTADORES DE CEFALIAS PRIMARIAS. FIGUEROLA, MARIA DE LOURDES; LEVIN, GLORIA; BRUERA, OSVALDO; MEDINA, CARLOS; LESTON, JORGE; BARONTINI, MARTA

Centro de Investigaciones Endocrinológicas CEDIE, CONICET, Hospital de Niños R Gutiérrez, Hospital de Clínicas. Buenos Aires.

Existe evidencia clínica y numerosos estudios que documentan la relación entre cefaleas y trastornos del sueño, aunque su conexión exacta aún es desconocida. Los cambios en la duración y calidad del sueño parecen ser capaces de afectar diferentes tipos de cefaleas. La cefalea en racimos y la migraña han sido relacionadas clásicamente con el sueño. La melatonina, una hormona producida en la glándula pineal y regulada por el núcleo supraquiasmático, podría tener un papel en la etiología y tratamiento de algunos tipos de cefaleas, a partir de la hipótesis que algunas cefaleas pueden ser una respuesta a una irregularidad en el ritmo circadiano pineal y que la administración de melatonina podría regularizar el ciclo y mejorar el dolor. Buscando una relación entre las etapas de sueño no REM (e2, e3 y e4), sueño REM, el despertar (D) y post- fotoestimulación (F), estudiamos los niveles de melatonina plasmática en un muestreo serial en cada etapa del sueño documentada por polisomnografía en cefalea en racimos (CR) (n=5), migraña crónica (MC) (n=5), cefalea tipo tensión crónica (CTTC) (n=5) y un grupo control (C) (n=6). Las polisomnografías no evidenciaron patología. El grupo C mostró un aumento nocturno adecuado y disminución a los valores controles del laboratorio en la mañana (REM: 80 ± 18 pg/ml, D: 13 ± 3 pg/ml, $p<0.01$). Los pacientes con CR se mantuvieron con niveles diurnos durante todo el estudio (REM: 16 ± 3 pg/ml, D: 14 ± 4 pg/ml), mientras que los grupos MC y CTTC tuvieron un aumento nocturno pero no alcanzaron a disminuir a los valores controles diurnos de nuestro laboratorio al despertar. Estos resultados señalan un compromiso a nivel de la regulación de los ritmos biológicos en aquellos pacientes con dolor craneano recurrente.

259. (3470) EXPRESIÓN DE ENDOTELINA-1 (ET-1) Y SUS RECEPTORES EN LA DEGENERACIÓN DE LA RETINA POR ILUMINACIÓN CONTINUA. TORBIDONI, ANA VANESA; PRASANNA, GANESH; SUBURO, ANGELA MARÍA

Facultad de Ciencias Biomédicas-Universidad Austral University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, Texas.

ET-1 es un péptido vasoconstrictor y regulador de sobrevida y proliferación celular. Ya que los astrocitos de la retina expresan ET-1, estudiamos la expresión de este péptido y sus receptores ET-A y ET-B durante la gliosis retinal inducida por iluminación continua. Utilizamos ratones BALB-c, expuestos a 1.500 lux por 1, 3, 6 o 18 días. Las retinas se incubaron con anticuerpos contra las moléculas mencionadas y contra marcadores gliales y de músculo liso. Además, analizamos los niveles del ARNm de ET-1 por RT-PCR semicuantitativa. Detectamos lesión de los fotorreceptores desde el día 6. La inmunoreactividad contra ET-1 y proteína glial fibrilar ácida (GFAP) permitió visualizar un aumento de los astrocitos a partir del día 3 de iluminación. Este incremento prosiguió hasta por lo menos el día 18. Simultáneamente, observamos un aumento de las prolongaciones perivasculares. Normalmente las células de Müller no expresan GFAP ni ET-1, pero luego de 3 días de iluminación exhibieron una fuerte inmunoreactividad para GFAP. Los astrocitos expresaron solamente el receptor ET-B, que también apareció en el endotelio de los vasos retinianos. La inmunoreactividad astrocitaria para ET-B aumentó significativamente a lo largo del período de iluminación. El receptor ET-A se encontró en el endotelio y en las células ganglionares de la retina, pero no detectamos cambios durante el período experimental. No encontramos aumentos relativos de ARNm ET-1/actina sino hasta los 18 días de tratamiento, probablemente porque la masa de los astrocitos es pequeña con respecto a la masa total de la retina. La ET-1 astrocitaria actuaría sobre vasos y células ganglionares. El péptido liberado por las prolongaciones perivasculares, que aumentan durante la degeneración, activaría los receptores endoteliales ET-A y ET-B. La coexistencia de ET-1 y ET-B en los astrocitos presupone un mecanismo autocrino, probablemente involucrado en el proceso de gliosis, tal como lo sugiere el aumento de ET-B durante la degeneración de la retina.

260. (3526) LOS ESTROGENOS REVIERTEN LA REDUCCION DE LA NEUROGENESIS EN EL CEREBRO DE RATONES DIABETICOS POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ).

SARAVIA, FLAVIA; REVSIN, YANINA; ROIG, PAULINA; HOMO-DELARCHE, FRANCOISE; DE NICOLA, ALEJANDRO

Instituto Biología y Medicina Experimental. Dpto Bioqca Fac Medicina,UBA;Cnrs7059, París VII, Francia

La diabetes mellitus se acompaña de alteraciones cerebrales, como hipersensibilidad al stress, disturbios cognitivos, demencia, y mayor riesgo de accidente cerebro-vascular. Anteriormente describimos cambios en la glia y neuronas hipocampales ligados a la diabetes experimental. La génesis de nuevas neuronas (neurogénesis) en el adulto es un evento plástico restringido a pocas áreas cerebrales: la zona subventricular (SVZ) y el giro dentado (GD). Nuestro 1er. objetivo fue estudiar si la neurogénesis estaba afectada en el ratón diabético por STZ en las áreas mencionadas. Analizando la incorporación de bromodesoxiuridina a células en división, observamos una fuerte disminución -cercana al 70%-en la tasa proliferativa en el ratón diabético luego de 20 días de inducción de la enfermedad, tanto en GD como en SVZ. Por otro lado, el rol de los estrógenos como activos neuroprotectores, actuando por diversas vías, está bien documentado en la literatura. El 2do. objetivo fue investigar si el 17 β estradiol (E2) podía restaurar la proliferación cerebral en el modelo de diabetes por STZ. Nuestros resultados demostraron que en ambas zonas estudiadas el implante de un pellet de E2 (200ug/12 mg colesterol) durante 10 días revirtió completamente la reducción de la proliferación celular del ratón diabético.

	CTL+ vehículo	CTL+E2	STZ+vehículo	STZ+E2
GD	14.4 \pm 2.0	10.2 \pm 1.1	4.8 \pm 1.9 P<0.001 vs Ctl+vehículo	14.9 \pm 1.1P<0.001 vs Ctl+E2
SVZ	27.5 \pm 4.4	24.0 \pm 2.2	4.1 \pm 2.3 P<0.01 vs Ctl+vehículo	40.3 \pm 1.1P<0.01 vs Ctl+E2

La administración de estrógenos no alteró el estado hiperglicémico de los animales y tampoco la tasa proliferativa neuronal en los controles. Nuevas investigaciones comprobarán el valor de los estrógenos como una herramienta adicional para el tratamiento de los trastornos cerebrales de la diabetes mellitus.

261. (3554) BDNF Y EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB: POSIBLES ALIADOS EN EL MECANISMO DE NEUROPROTECCIÓN POR PROGESTERONA (PROG).

GONZALEZ, SUSANA LAURA; LABOMBARDA, FLORENCIA; GONZÁLEZ DENISELLE, CLAUDIA; LIMA, ANALIA; DE NICOLA, ALEJANDRO

Instituto de Biología y Medicina Experimental-Dto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.

Las neurotrofinas, entre ellas BDNF, han sido señaladas como mediadores de la neuroprotección esteroidea. Previamente demostramos que la PROG estimula la síntesis de BDNF en motoneuronas de la médula lesionada que expresan el receptor TrkB. Dado que el factor de transcripción fosforilado CREB (pCREB) es un mediador de la activación transcripcional inducida por neurotrofinas, evaluamos por medio de técnicas inmunohistoquímicas la expresión neuronal de esta proteína en el modelo de transección espinal completa (TRX). En los animales TRX, la intensidad de la inmunomarcación nuclear (ILIGV/um²) para pCREB disminuyó con respecto al grupo control (CTL: 0.586 \pm 0.019 vs. TRX: 0.394 \pm 0.018, p<0.01). El tratamiento con PROG (4mg/kg/día x 3 días) aumentó significativamente la expresión de pCREB en las neuronas de los animales lesionados (TRX+PROG: 0.903 \pm 0.037 vs. TRX, p<0.001). Se analizó, además, la reacción cromatolítica como índice de la respuesta neuronal a la lesión. El análisis de los histogramas de frecuencia (X²=210.08, p<0.0001) reveló que

el 80-90% de las neuronas de los grupos CTL y CTL+PROG presentaban basofilia normal luego de la tinción de Nissl. El grupo TRX mostró un predominio de neuronas con cromatólisis severa (72%) y moderada (26%) y sólo un 1% de neuronas con basofilia normales (p<0.005 vs. CTL y CTL+PROG). PROG redujo el porcentaje de neuronas cromatolíticas al 20%, asemejándose al grupo CTL (TRX vs. TRX+PROG, p<0.05). Los resultados sugieren que la PROG revierte el perfil cromatolítico típico de las neuronas injuriadas y promueve, a través de BDNF, la estimulación de pCREB, un potente regulador transcripcional y posible mediador de los efectos neuroprotectores de PROG.

262. (3571) MAPEO HISTOLÓGICO DE GLICANOS EN EL HIPOCAMPO DE RATAS ADULTAS COMO BASE PARA FUTUROS ESTUDIOS NEUROGLICOBIOLOGICOS. HIDALGO, ALEJANDRA; BURGOS, VALERIA; *VIOLA, HAYDÉE; *MEDINA, JORGE; ARGIBAY, PABLO

*Instituto de ciencias básicas y medicina experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires *Instituto de Biología y Neurociencias Profesor Dr Eduardo de Robertis, Facultad de Medicina UBA.*

Existe evidencia de que diversos glicoconjugados estarían involucrados en procesos relacionados con la adquisición de memoria, fenómenos de plasticidad neuronal y otras funciones relacionadas con el hipocampo. Las lectinas son ligandos naturales y específicos para diversos azúcares y por lo tanto una herramienta esencial para la detección histoquímica de glicanos terminales. El objetivo del presente trabajo es identificar la distribución normal de azúcares terminales expresados en glicoproteínas del hipocampo con el fin de diseñar un mapa de expresión de dichas moléculas como base de futuras experiencias. Se estudiaron 9 cerebros de ratas Wistar machos de 170-190g de peso fijados en Bouin e incluidos en parafina, se realizó histoquímica de lectinas para: VVL (alfa/betaNacGal terminal), GNL (Man alfa1,3 terminal), PNA(Gal beta1, 3NacGal), ECA(Gal beta-1,4NacGlu), SNA(SA en alfa-2,6Gal), MALII(SA en alfa-2,3), WGA(NAcGlc terminal con/sin SA), sWGA(NAcGlc terminal sin SA), GSLII(alfa-beta-NAcGlc terminal). En todos los casos se controlaron las marcaciones a través de inhibición competitiva con los ligandos naturales de las lectinas. En el neuropilo de la capa alveolar de todo el hipocampo se observó marcación positiva franca para VVL y PNA. Las células piramidales del hipocampo mostraron una marcación citoplasmática predominante para GNL. En el giro dentado la marcación indicó un patrón de expresión de PNA en la capa polimórfica. En la membrana de células piramidales aisladas de la zona CA1 se observó marcación positiva para VVL. Estos resultados muestran que el hipocampo de rata normal adulta presenta en las distintas capas de las diferentes regiones hipocampales una expresión diferencial de glicoconjugados coexistiendo en algunos casos diferentes azúcares en una misma región. Esto podría estar relacionado con procesos múltiples y simultáneos de reconocimiento celular los que deberán ser elucidados en modelos experimentales

263. (3575) LA PROGESTERONA (PROG) REESTABLECE LA MIELINIZACIÓN EN UN MODELO DE LESIÓN DE LA MEDULA ESPINAL (ME). LABOMBARDA, FLORENCIA; GONZÁLEZ, SUSANA; LIMA, ANALÍA; ROIG, PAULINA; DE NICOLA, ALEJANDRO

Instituto de Biología y Medicina Experimental y Dpto de Bioquímica Humana, Facultad Medicina, UBA

La PROG ejerce múltiples efectos neuroprotectores, entre ellos aumenta la tasa de mielinización, regulando la síntesis de las proteínas de la mielina de nervios periféricos lesionados. Las lesiones de la ME estimulan la proliferación de oligodendrocitos (OLIG) progenitores pero disminuyen la expresión de la proteína básica de la mielina (MBP), constituyendo un modelo adecuado de desmielinización. En este trabajo estudiamos por inmunohistoquímica los efectos de la PROG (4mg/kg/día x 3 días) sobre la

expresión de la proteína básica de la mielina (MBP), tomada como índice de mielinización y sobre el número de células que expresan el proteoglicano de membrana NGII (progenitores de OLIG), en ratas con transección (TRX) completa de ME. La TRX disminuyó los niveles de densidad óptica para MBP (TRX: 0.042 ± 3.84 10⁻³ vs CTL: 0.069 ± 6.51 10⁻³, $p < 0.01$ ANOVA) y aumentó el número de NGII (TRX: 41.55 ± 5.49 vs CTL, muy baja expresión, $p < 0.001$ ANOVA). La PROG recuperó la expresión de MBP (TRX+PROG: 0.080 ± 5.53 10⁻³ vs TRX, $p < 0.001$ ANOVA) y aumentó aún más el número de progenitores (TRX+PROG: 62.5 ± 1.5 vs TRX, $p < 0.05$ ANOVA) en los animales lesionados. Estos efectos se explicarían por dos mecanismos: 1) participación directa de PROG sobre mielinogénesis; 2) estimulación por PROG de progenitores NGII, sabiendo que estas células pueden migrar, proliferar y diferenciarse en OLIG maduros mielinizantes.

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ORAL

PREMIO COSSIO

En virtud de que serán pre-seleccionados por los Jurados 6 postulantes para concursar por los respectivos Premios en las sesiones dedicadas a los mismos, los inscriptos no seleccionados, presentarán sus trabajos en las sesiones de sus áreas temáticas correspondientes.

264. (3478) BASES PARA UN DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ORIGINAL ENTRE OSTEOPENIAS "METABÓLICAS" Y "MECÁNICAS" EN MUJERES FRACTURADAS EMPLEANDO DEXA. CAPOZZA, RICARDO; COINTRY, GUSTAVO; FERRETTI, JOSÉ LUIS

Centro de Estudios de Metabolismo Fosfocálcico (CEMFOC) CEMFOC, UNR, Rosario

La DEXA podría analizar relaciones hueso / músculo (CMO / masa magra, MM) y distinguir osteopenias de etiología "mecánica" (descarga esquelética) y "metabólica" (perturbación de las células óseas) en base a los z-scores de esas curvas. Para validarlo, correlacionamos datos de CMO y MM para las pre-MP con fracturas de miembros inferiores (MI) de 623 mujeres pre- y post-MP fracturadas en localizaciones especiales (cadera, columna, muñeca, brazo, pierna; Tipo I, n=396) u otras (Tipo II; n=227), y calculamos sus z-scores CMO/MM según curvas de referencia determinadas en 814 pre- y 1656 post-MP normales. Los z-scores CMO/MM del conjunto de fracturadas Tipo II fueron similares al control; pero los de fracturadas Tipo I fueron significativamente menores ($p < 0.001$). Las curvas CMO vs MM para las pre-MP con fracturas Tipos I ó II, y para las post-MP con fracturas Tipo II, fueron similares al control en CE y MI, con z-scores CMO/MM normales. Las post-MP con fracturas Tipo I, en cambio, mostraron relaciones curvilíneas, con CMO (y z-score CMO/MM) decreciente a MM bajas. El SEE de las curvas (indicador de dispersión) fue menor en MI que en CE ($p < 0.01$). La osteopenia "metabólica" (z-score CMO/MM bajo) predominó en las fracturas Tipo I, y la "mecánica" (z-score CMO/MM normal) en las Tipo II. Las fracturas por osteopenias "metabólicas" fueron atributo casi exclusivo de las post-MP, especialmente prevalentes a bajas MM (falta de potenciación estrogénica del estímulo mecánico). Las determinaciones en MI ofrecerían igual o mejor confiabilidad que en CE. Este nuevo uso de la DEXA optimizaría el diagnóstico de osteopenias de distinto tratamiento (físico las "mecánicas", farmacológico las "metabólicas"), permitiendo su monitoreo con criterio biomecánico a bajo costo.

265. (3485) DETERMINACIÓN DE OXIDO NITRICO SINTASA INDUCIBLE EN TEJIDO VESICAL. ROL COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CÁNCER DE VEJIGA. SANDES, EDUARDO OMAR; RIVEROS, MARÍA DORIS; FALETTI, ALICIA GRACIELA; VIDAL, MARÍA DEL

CARMEN; GIMENEZ, LILIANA; CASABÉ, RICARDO ALBERTO; EIJÁN, ANA MARÍA

Inst. A.H. Roffo CEFyBo, CONICET

Anteriormente observamos que pacientes con cáncer de vejiga presentan niveles altos de óxido nítrico (NO) en orina. Ahora estudiamos la expresión de la enzima NO sintasa inducible (iNOS) en 42 muestras de tejido vesical tumoral (TV), 22 de no tumoral (NT) de pacientes con cáncer de vejiga y en 4 muestras de epitelio vesical normal por la técnica de Western blot y evaluamos su función como factor pronóstico. La iNOS se detecta tanto en TV (20/42) como en NT (9/22), encontrando en cada par TV/NT estudiado concordancia en la expresión, mientras que no es detectada en vejiga normal. Dado que resultados similares se observaron cuando se determinó la actividad posiblemente los niveles elevados de NO en orina sean generados por la iNOS presente en el tumor y en la zona no tumoral del paciente con cáncer de vejiga. Por inmunohistoquímica observamos iNOS en células tumorales y en epiteliales NT con una distribución heterogénea, no detectándose en epitelio normal. El seguimiento de 21 pacientes durante dos años, indica que el 80% (8/10) con iNOS positiva presentó recurrencia, mientras que el 73% (8/11) con iNOS negativa, no recurrió en este período (riesgo relativo 2.933, $p = 0.0226$ Test exacto de Fisher). Dado que no hay correlación con el grado histológico o el de invasión nuestros resultados sugieren su utilidad como marcador pronóstico independiente en pacientes con esta patología.

266. (3646) PROGRESIÓN DE LA POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE (PQRAD): INFLUENCIA DE POLIMORFISMOS DE GENES DE NO SINTASA ENDOTELIAL (eNOS) Y DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA. AZURMENDI, PABLO; FRAGA, ADRIANA; MUCHNIK, CAROLINA; DOS RAMOS FARIAS, MARIA; GALAN, FELICITAS; GUERRA, DANISA; O'FLAHERTY, MARTIN; ARRIZURIETA, ELVIRA; MARTIN, RODOLFO

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Fac. Med., U.B.A. Hospital Universitario Austral, Universidad Austral

La velocidad de progresión (VdP) de la (PQRAD) es muy variable, aún en presencia de la misma mutación. El efecto de posibles genes modificadores del fenotipo, cobra interés pronóstico. Estudiamos los polimorfismos AGTM235T del angiotensinógeno, AT1A1166C del receptor de angiotensina II tipo 1 y eNOSGlu298Asp del eNOS, en 68 pacientes con un seguimiento (X \pm SE) de 5.9 ± 0.6 años. La VdP fue estimada por 1/Crpl vs edad y expresada como caída del filtrado glomerular. Consideramos edades de Crpl 2 y 6 mg/dl, como comienzo de progresión (E2) y arriba a IRCT (E6) respectivamente. Se registró presión arterial (TAM). Los polimorfismos se realizaron por reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos y digestión con enzimas de restricción que reconocen los alelos de cada uno. La distribución alélica y genotípica no fue diferente en 56 pacientes y 38 controles encontrándose en equilibrio de Hardy-Weinberg. VdP fue 6.8 ± 0.5 ml/min/año, E2 y E6 48.8 ± 1.5 y 54.7 ± 1.7 años y TAM 110.4 ± 1.5 mmHg para todo el grupo (n=68). De acuerdo a E6 observamos dos grupos (<ó= y > a 55años) con variables clínicas distintas. En <ó= 55 (fenotipo PKD1, n=32), E2 y E6 del genotipo CC de AT1A1166C fueron 36.0 ± 1.4 y 41.0 ± 1.1 años vs AA-AC (41.4 ± 1.4 y 45.8 ± 1.3 respectivamente, $p < 0.02$). En AGTM235T la VdP resultó mayor en los TT (13.6 ± 2.0) vs MM-MT (7.8 ± 0.6 ml/min/año, $p < 0.003$) en el mismo grupo. El eNOSGlu298Asp no mostró diferencias en las variables clínicas. TAM no correlacionó con polimorfismos ni variables clínicas. El genotipo CC de AT1A1166C se asocia a anticipación de E2 y E6 en 5 años, mientras que el TT de AGTM235T duplica la VdP, indicando un posible efecto de los genes del sistema renina-angiotensina e independiente de TAM. El eNOSGlu298Asp no tendría efecto sobre la evolución de la enfermedad.

267. (3690) ANÁLISIS DE REDES NEURONALES INVOLUCRADAS EN EL LENGUAJE A PARTIR DEL ESTUDIO DE MANIFESTACIONES LINGÜÍSTICAS DURANTE CRISIS EPILÉPTICAS PARCIALES. GIAGANTE, BRENDA; ODDO, SILVIA; MELCOM, CARLOS; SOLIS, PATRICIA; SILVA, WALTER; CONSALVO, DAMIAN; AUCCELI, AQUILES; CENTURION, ESTELA; SAIDON, PATRICIA; KOCHEN, SILVIA

Centro de Epilepsia, Div Neurología Htal R Mejía Inst de Biología Celular Dr Eduardo De Robertis UBA CONICET. CEFYBO

Introducción y objetivos: Analizamos los mecanismos involucrados en la producción del lenguaje a partir del estudio de manifestaciones lingüísticas presentes en crisis epilépticas. Material y Método: Analizamos crisis de pacientes estudiados a través del registro simultáneo de las manifestaciones clínicas y EEG (video-EEG). Seleccionamos las crisis que presentaban manifestaciones del lenguaje. Clasificamos estas manifestaciones de acuerdo a la presencia de síntomas excitatorios e inhibitorios en Vocalización ictal: sonidos monosilábicos sin contenido lingüístico. Lenguaje ictal normal: palabras lingüísticamente correctas. Lenguaje ictal anormal: palabras lingüísticamente incorrectas. Lenguaje postictal anormal: afasia, parafasias, anomias. De acuerdo a lugar de origen (zona epileptógena, ZE) clasificamos a las crisis en 2 grupos subdivididas a su vez por lateralidad: 1 epilepsia del lóbulo temporal (ELT) izquierda y derecha, y 2- epilepsia extraTemporal (EXT) izquierda y derecha. Correlacionamos las manifestaciones del lenguaje con la ZE. Resultados: Seleccionamos 137 crisis en 54 pacientes. Vocalización ictal 49% crisis, no hubo diferencias significativas en relación a la localización ni lateralización de la ZE. Lenguaje ictal normal 26% crisis, el 83% con ZE del lado derecho ($p < 0.001$) siendo más frecuente en ELT (83%). Lenguaje ictal anormal 16% crisis, el 77% con ELT, sin valor para localizar ni lateralizar la ZE Lenguaje anormal postictal 38% crisis, el 79% con ELT ($p 0.004$) y en el 83% del lado izquierdo ($p 0.001$) Conclusión: Las manifestaciones del lenguaje son un síntoma frecuente en crisis parciales y contribuyen en la identificación de las redes neuronales involucradas en la producción del lenguaje. El lenguaje ictal normal y la afasia post-ictal presentaron valor para localizar y lateralizar la ZE a nivel Temporal derecho e izquierdo respectivamente.

268. (3708) ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN EPILEPSIA. CONSALVO, DAMIÁN; KOCHEN, SILVIA; SALGADO, PABLO; ODDO, SILVIA; GIAGANTE, BRENDA; SAIDÓN, PATRICIA; SICA, ROBERTO

Centro de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía, Fundación FEMIEN, Ministerio de Salud de la Nación CONICET, UBA.

Introducción: En un enfermo con epilepsia, una vez establecido el diagnóstico, no son claros los factores que determinan el pronóstico. El objetivo del estudio fue analizar los factores pronósticos en enfermos con epilepsia en relación con la respuesta al tratamiento farmacológico. Material y Métodos: Se seleccionaron pacientes con epilepsia que contaban con Imágenes por Resonancia Magnética (IRM) cuya zona epileptógena se estableció en base a las características clínico-EEG. Se definió a un paciente como No respondedor al tratamiento cuando no lograba el control de las crisis con el uso de al menos 2 drogas clásicas, solas o en combinación, más el agregado de una droga nueva. Se clasificaron en 2 grupos: No Respondedores (G1) y Respondedores (G2). Se analizaron las variables edad, edad de primera crisis (EPC), tiempo de evolución de la epilepsia (TE), zona epileptógena y el valor predictivo de las IRM. Resultados: G1: $n=171$ (45.2%), edad media 30.8 ± 12.1 , TE 20 ± 10.8 , EPC 10.7 ± 10.2 . Temporales 93 (54.4%); Frontales 56 (32.7%); Parieto-occipitales 13 (7.6%); Generalizados 9 (5.3%). IRM anormal: 113 (66.1%). G2: $n=207$ (54.8%), edad media 34 ± 15.8 , TE 14.8 ± 13.3 , EPC 19.2 ± 16.7 . Temporales 66 (31.9%); Frontales 70 (33.8%); Parieto-occipitales 23 (11.1%); Generalizados 48 (23.2%). IRM anormal: 72 (34.8%). Hubo diferencias en edad ($p < 0.02$) y EPC

($p < 0.01$) menor en G1 y TE ($p < 0.01$) menor en G2. Los Generalizados fueron más frecuentes en G2 ($p < 0.01$) y los Temporales más en G1 ($p < 0.03$). El valor predictivo (VP) positivo de las IRM en relación con la no respuesta al tratamiento fue del 61.1%. El VP negativo de las IRM en relación con la respuesta al tratamiento fue del 69.9%. Los enfermos No respondedores se comportan de manera diferente a los respondedores analizando el factor tiempo. Los portadores de una epilepsia Generalizada tienen mejor pronóstico, mientras que los que tienen epilepsia Temporal tienen peor pronóstico evolutivo. Las IRM son de gran utilidad en establecer un pronóstico en epilepsia.

269. (3732) ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS DEL RECEPTOR DE LA ANGIOTENSINA TIPO 1 (AT1R) Y LA RESPUESTA HEMODINÁMICA AL LOSARTAN EN CIRROSIS CON HIPERTENSION PORTAL. SOOKOIAN, SILVIA; CASTAÑO, GUSTAVO OSVALDO; GARCÍA, SILVIA INÉS; STEPPAT, NATALIA; VIUDEZ, PEDRO; GONZALEZ, CLAUDIO; PIROLA, CARLOS JOSÉ

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari

La eficacia terapéutica del losartan en hipertensión portal es aproximadamente 50 %. Nuestro objetivo fue relacionar la respuesta hemodinámica (cateterismo de vena suprahepática y ecografía Doppler Duplex) a 25 mg/día/ 3 meses de losartan con los genotipos de componentes del sistema renina-angiotensina (ACE I/D, AGT T174M, AT1R A1166C, PCR-RFLP) en 19 pacientes con cirrosis y varices esofágicas. Se consideró respuesta (Resp) a una disminución del gradiente de presión de venas suprahepáticas (GPVS) = o > a 20%. Diez de 19 pacientes respondieron. Los homocigotas AA del AT1R presentaron una mayor disminución porcentual del GPVS postratamiento, una mayor presión de vena suprahepática libre (PVSL) basal y post-tratamiento, y una mayor presión capilar pulmonar (PCP) basal. No se encontró ninguna asociación con los demás genotipos.

Genotipos AT1R	Resp./ No Resp.	GPVS (%) variación	PVSL Basal (mmHg)	PVSL Post tratamiento (mmHg)	PCP Basal (mmHg)
AA	9/4	-31± 19	10.2± 3.4	11.7± 4.5	14.2± 7.0
AC + CC	1/5	-11± 12	6.0± 2.1	7.3± 2.7	7.0± 3.7
p	0.03	0.03	0.02	0.04	0.03

El genotipo AA del AT1R podría estar relacionado con la eficacia terapéutica del losartan en pacientes cirróticos con hipertensión portal, probablemente condicionando el estado hemodinámico basal.

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS POSTER

INMUNOLOGÍA VII

270. (3229) EXPRESIÓN DEL MARCADOR CD5 EN LINFOCITOS B DE NIÑOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA BAJA (IRAB) POR VIRUS SINICIAL RESPIRATORIO. BALBARYSKI, JEANETTE; BARBONI, GRACIELA; RAIDEN, SILVINA; GADDI, EDUARDO; QUIROZ, HÉCTOR; COCCA, ANDREA; GIRAUDI, VERA

Hospital P. Elizalde

El sistema inmune contiene una subpoblación de células BCD5+ (B1) asociadas con la producción, independiente de las células T, de anticuerpos naturales que participan en la defensa temprana frente a bacterias y virus. Se estudió el inmunofenotipo linfocitario en sangre periférica de 25 niños con edades comprendidas entre 6 meses y 3 años con IRAB por virus sincicial respiratorio (VSR) al comienzo de la infección, confirmada por clí-

nica, radiología y serología. Con fines comparativos se incluyó un grupo control de 10 niños sanos en similar intervalo etario. Los anticuerpos monoclonales ensayados fueron específicos para CD45, 14, 19, 5, 10, 72, 3, 4, 8, 16/56 y un control isotípico IgG1/IgG2, siendo analizados por citometría de flujo mediante el programa CellQuest. Se observó un incremento significativo ($P < 0,05$) en los porcentajes de células CD19+ (45 ± 6 vs 19 ± 6) y células BCD5+ (36 ± 8 vs 23 ± 4) en los niños infectados con respecto al grupo control. Las células TCD3+ presentaron valores significativamente disminuidos ($P < 0,05$) en relación a los controles (47 ± 7 vs 69 ± 8), mientras que no se observaron diferencias en los cocientes CD4/CD8, ni en los niveles de células CD16/56+. El aumento porcentual de células BCD5+ sería el resultado de la interacción entre determinantes antigénicos del VSR y mecanismos inmunes innatos de primera línea actuantes hasta el completo desarrollo de la respuesta inmune adaptativa

271. (3402) EXPRESIÓN DE DOS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN SOBRE NEUTRÓFILOS EN NIÑOS HIV(+). GADDI, EDUARDO; BALBARYSKI, JEANETTE; CANTISANO, CLAUDIO; RAIDEN, SILVINA; CANDI, MARCELA; GIRAUDI, VERA

Hospital P Elizalde

Los polimorfonucleares neutrófilos ejercen la mayoría de sus funciones en tejidos fuera del sistema circulatorio, por lo cual, para ingresar a los mismos deben efectuar un rolling, adherir a la pared vascular y luego migrar a través del endotelio. Dicha migración está mediada por múltiples interacciones de receptores específicos para la adhesión tales como: selectinas e integrinas. Los niveles de expresión sobre neutrófilos de la cadena alfa de la $\beta 2$ integrina (CD11a) y de la selectina leucocitaria (CD62L) fueron estudiados en sangre periférica de 20 niños HIV(+) en su primera evaluación clínica-inmunológica. Los pacientes cursaban distintas enfermedades asociadas a su enfermedad de base y no recibían medicación antirretroviral. Se trabajó con sangre entera heparinizada y la inmunomarcación se realizó inmediatamente después de obtenida la muestra. En un grupo control de 24 niños sanos se procesaron los mismos marcadores con fines comparativos. El porcentaje de co-expresión de CD11a/CD62L sobre los neutrófilos de niños HIV(+) se encontró significativamente disminuido ($P < 0,05$) con respecto al grupo control (92 ± 4 vs 95 ± 2). La intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD62L también resultó significativamente disminuida (75 ± 25 vs 135 ± 65) mientras que no hubo diferencia en la IMF de CD11a entre ambos grupos. La disminución en el nivel de expresión de CD62L sobre los neutrófilos periféricos durante la infección por HIV sugiere activación celular. Esta disminución podría comprometer la actividad inflamatoria de los mismos en el foco infeccioso.

272. (3407) COMPORTAMIENTO DE LA L-SELECTINA LINFOCITARIA EN EL HIV PEDIÁTRICO. QUIROZ, HÉCTOR; GADDI, EDUARDO; BARBONI, GRACIELA; CANDI, MARCELA; BALBARYSKI, JEANETTE; GIRAUDI, VERA

Hospital P Elizalde

Durante la infección por HIV la disminución en el número de LTCD4 circulantes está relacionada primariamente con la acción viral, pero podría además ser el resultado de alteraciones en la migración y distribución linfocitaria dentro del organismo. La expresión de CD62L sobre linfocitos periféricos fue estudiada en dos situaciones: a) en 19 niños HIV(+) en la primera consulta inmunológica luego de la confirmación diagnóstica, b) en 9 niños al inicio de la terapia con inhibidores de proteasa (IP) y luego de 6 meses de implementada la misma. Fueron evaluados anticuerpos monoclonales específicos para CD3, CD4, CD8, CD15 (FITC) y CD62L (PE). Los mismos anticuerpos fueron ensayados sobre un grupo control de 17 niños sanos. La respuesta terapéutica y la adherencia al tratamiento se evaluó mediante la determinación de la carga viral plasmática (CV). Los niveles de expresión de CD62L (%) sobre LTCD3, LTCD4, LTCD8 y sobre la totalidad del gate

linfoide en los pacientes HIV(+) mostró valores significativamente disminuidos ($P < 0,05$) con respecto al grupo control ($30,1 \pm 9,8$ vs $72,4 \pm 13,1$; $70,7 \pm 8,7$ vs $86,0 \pm 7,2$; $14,5 \pm 9,9$ vs $58,5 \pm 20,4$; $50,8 \pm 7,82$ vs $78,4 \pm 7,5$, respectivamente). En los pacientes en seguimiento la disminución significativa ($P < 0,01$) en la CV no se acompañó de modificaciones en la expresión de CD62L. La activación inmune producto de la actividad viral se acompañaría de la disminución en la expresión de CD62L. Si bien con el IP se consiguió una excelente respuesta virológica, ésta no se correlacionó con una evolución inmune equivalente, en el lapso de seguimiento.

273. (3409) LA INMUNIZACIÓN POR VÍA INTRANASAL CON P6 RECOMBINANTE MÁS ADDP COMO ADYUVANTE DE MUCOSAS, PROTEGE DE LA INFECCIÓN PULMONAR Y LA OTITIS MEDIA CAUSADA POR HAEMOPHILUS INFLUENZAE NO-TIPIFICABLES. BERTOT, GUSTAVO MIGUEL; BECKER, PABLO; RESTELLI, MARCELA; GUZMÁN, CARLOS; GRINSTEIN, SAÚL

Lab. Virología Hosp. Niños R. Gutierrez Grupo de Investigación sobre Vacunas, GBF, Alemania

Los H. influenzae no-tipificables (NTHi) son uno de los principales patógenos causantes de otitis media y exacerbación de bronquitis crónica. Una lipoproteína P6, altamente conservada en cepas tipificables y no-tipificables, es candidata para una vacuna preventiva contra H. influenzae. Su pobre expresión y las condiciones fastidiosas de crecimiento bacteriano, constituyen un problema para producción a gran escala. Hemos demostrado que la P6 recombinante (rP6) es capaz de inducir una respuesta sistémica y de mucosas específica al administrarse por vía nasal con adamantilamida dipéptido (AdDP) como adyuvante de mucosas. Nuestro objetivo fue evaluar la eficacia de esta formulación vacunal usando dos modelos animales diferentes de infección experimental. Ratonos inmunizados por vía intranasal a día 0, 7 y 14 con PBS, AdDP, P6 + AdDP o rP6 + AdDP se infectaron a día 21 por vía intratraqueal o en la cavidad del oído medio con 5×10^8 UFC de NTHi. Se determinó el número de bacterias viables recuperadas en lavado bronqueoalveolar, 4 horas posteriores al desafío pulmonar o, en lavado de oído medio, 4 días posteriores a la infección del oído. Los resultados fueron analizados usando el test no-paramétrico de Mann-Whitney. Los animales inmunizados con P6 nativa o rP6 muestran una reducción del 90% y 86%, respectivamente, en el número de bacterias viables recuperadas respecto de los animales control ($p < 0,03$). Los ratones vacunados con rP6 + AdDP muestran un clearance bacteriano del oído medio más rápido que los animales controles no vacunados ($p < 0,01$), observándose un 93% de reducción en número de bacterias viables recobradas respecto del control. Nuestros resultados demuestran que la inmunización intranasal con rP6 + AdDP puede proteger, en grado similar a la P6 nativa y, eficientemente contra las infecciones de tracto respiratorio bajo y del oído medio causadas por NTHi.

274. (3414) NIVELES DE IFN-GAMMA EN NIÑOS ASMÁTICOS CON ANTECEDENTES DE BRONQUIOLITIS VIRAL Y SU CORRELACION CON OTROS PARAMETROS DE ALERGIJA. MALDONADO, ANA M.; WITOWSKI, ELIZABETH M.; DÍAZ, FERNANDO M.; TARANILLA, ALEJANDRO G.; SABINI, LILIANA I.; TORRES, CRISTINA V.; LORIO, FANNY B.; PANIGHEL, SILVIA R.

Cátedra de Inmunología. UNRC Cátedra de Inmunología y Cátedra de Virología. UNRC

En el lactante atópico la infección por VRS sería un factor desencadenante y exacerbante de asma. Es posible la antigenicidad cruzada entre antígenos virales y alérgenos. En niños asmáticos con antecedentes de bronquiolitis nos propusimos investigar las concentraciones de IFN-gamma en sueros y sobrenadantes de cultivos de linfocitos y la correlación de esos valores con los títulos de Acs-VRS, niveles de IgE-VRS, IgE total y eosinofilia de exudado nasal. Se estudiaron 16 niños alérgicos

asmáticos de 12 a 40 meses de edad. De ellos 8 tenían antecedentes de bronquiolitis. Se investigaron por EIA los niveles de IFN-gamma en sueros y sobrenadantes de cultivos estimulados con PHA-M. Se evaluaron por IFI Acs-VRS sobre células Hep2 infectadas con VRS-B. Los niveles de IgE total e IgE-VRS por EIA y eosinofilia nasal por la técnica de Hansel. En niños con antecedentes de bronquiolitis, respecto al grupo sin antecedentes, se observaron: menores niveles de IFN-gamma ($p < 0.0001$) en sueros, no en sobrenadantes de cultivos; títulos más altos de Acs-VRS, niveles superiores de IgE ($p < 0.005$) e IgE-VRS ($p < 0.005$) y mayor grado de eosinofilia. Se observó alta correlación negativa entre niveles de IFN-gamma y cada uno de los otros parámetros ($R(2) = / < 0.77$). La disminución de IFN-gamma en sueros pudo ser defecto de síntesis por LTh1, células NK o falta de IL-12 por CPA. En estos pacientes la secreción de IFN-gamma estaría retardada pues no mostró diferencias en los sobrenadantes de cultivos de 48hs. Se observaron los efectos de IL-4 e IL-5 por mayores niveles de IgE y eosinofilia en mucosas. La desviación Th2 habría facilitado y agravado la infección viral. En niños de riesgo, la detección precoz de bajos niveles de IFN-gamma y su restitución serían medidas adecuadas de terapia preventiva de la severidad de los síntomas de alergia.

275. (3572) PERFIL DE CITOQUINAS INTRACITOPLASMÁTICAS EN NIÑOS CON SÍNDROME DE HIPER IGE.
RAIDEN, SILVINA; GADDI, EDUARDO; BALBARYSKI, JEANETTE; CANTISANO, CLAUDIO; QUIROZ, HÉCTOR; GIRAUDI, VERA

Hospital Pedro de Elizalde.

El síndrome de hiper IgE (SHlgE) es una inmunodeficiencia poco frecuente caracterizada por infecciones en piel y niveles elevados de IgE, relacionados con un perfil predominante TH2. Trabajos previos demuestran una disminución en los niveles de interferón-gamma y TNF-alfa en linfocitos T circulantes provenientes de pacientes con SHlgE. En el presente trabajo analizamos por citometría de flujo, la presencia de IL-2 e IL-4 intracitoplasmáticas en linfocitos TCD4 positivos circulantes, en 5 niños con diagnóstico posible o probable de SHlgE, valorados según el score de Grimbacher. A tal efecto las células mononucleares de sangre periférica fueron estimuladas con enterotoxina B de estafilococo ($1\mu\text{g/ml}$) durante 4 horas (determinaciones de IL-2) y 24 horas (determinaciones de IL-4). Encontramos una disminución significativa en el porcentaje de células TCD4 positivas para IL-2 en los pacientes con SHlgE en relación a los controles ($X \pm ES$): 0.54 ± 0.17 vs 2.65 ± 0.22 (SHlgE vs controles, $P < 0.01$). Por el contrario encontramos un aumento significativo en el porcentaje de células TCD4 positivas para IL-4, en 4 de los 5 pacientes con SHlgE estudiados ($X \pm ES$) 0.93 ± 0.08 vs 0.48 ± 0.10 (SHlgE vs controles, $P < 0.05$). La disminución en el porcentaje de células TCD4+/IL-2+ y el aumento en el porcentaje de células TCD4+/IL-4+ en los pacientes con SHlgE sustentan el predominio del perfil TH2 en la población estudiada.

276. (3626) ESTUDIO DEL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A NASOFARINGE DE RATAS WISTAR EN UN MODELO DE INMUNODEFICIENCIA SECUNDARIA.

SOSA, GUSTAVO; QUIROGA, FLORENCIA; ROUX, MARÍA ESTELA

Laboratorio de Inmunología Celular, Cát. de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, UBA. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio con ratas Wistar han demostrado alteraciones permanentes en intestino delgado, y más severas aún en bronquios, en un modelo de inmunodeficiencia secundaria por déficit proteico severo al destete, seguido por renutrición con dieta de caseína al 20 % durante 21 días (grupo R21). El objetivo de este trabajo fue analizar por citometría de flujo, en el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT), las subpoblaciones de linfocitos T y sus coexpresiones en nuestro modelo experimental (R21) respecto de

ratas controles de igual edad (grupo C60). Se prepararon suspensiones celulares de NALT que luego fueron marcadas con los anticuerpos correspondientes para su análisis en un citómetro de flujo. Los resultados están expresados como $X \pm E.S.$, C60 vs R21 ($n=5$). Células T: CD4+: 37.9 ± 12.2 vs 66.0 ± 9.2 , $p=NS$; CD8a+: 6.8 ± 0.5 vs 3.3 ± 1.3 , $p=0.0301$; TCRab+: 50.3 ± 14.5 vs 27.1 ± 1.1 , $p=0.040$; TCRgd+: 0.95 ± 0.22 vs 0.92 ± 0.16 , $p=NS$; CD8a+TCRgd+: 0.72 ± 0.52 vs 0.79 ± 0.54 , $p=NS$; CD4+TCRab+: 37.2 ± 10.4 vs 25.3 ± 10.4 , $p=NS$. Conclusiones: de acuerdo con estos resultados se puede observar que: 1) los fenotipos predominantes en el NALT de ratas normales son CD4 y TCRab; 2) que las subpoblaciones TCRab y CD8a+ disminuyen en los animales R21; y 3) que la subpoblación CD4+ en R21 no está alterada, y esto está de acuerdo con estudios previos en los que se observó que el número de linfocitos B IgA+ no estaba alterado. Estos resultados nos indican un comportamiento único del NALT, dentro del sistema inmune común de mucosas, en nuestro modelo experimental. UBA B064.

277. (3715) LINFOHISTIOCITOSIS HEMOFAGOCÍTICA FAMILIAR: MUTACION EN EL GEN PERFORINA. GALICCHIO, MIGUEL¹; ZIRONE, SANDRA¹; FLYNN, LUIS¹; SCIACALUGA, SILVIA¹; TAMUSCH, HECTOR¹; FIRPO, FERNANDA¹; OLEASTRO, MATIAS²; DANIELIAN, SILVIA²

Hospital Niños Victor J Vilela; ¹Sanatorio de Niños, Rosario; ²Hospital Nacional de Pediatría "Prof Dr Juan P Garrahan" Bs As

La linfocitosis hemofagocítica familiar (LHF), forma hereditaria de la linfocitosis hemofagocítica, es un raro desorden autosómico recesivo. Se caracteriza por una activación inadecuada de linfocitos T y macrófagos que conducen a la muerte en ausencia de tratamiento. Clínicamente presentan fiebre, hepatoesplenomegalia y citopenias. El único tratamiento curativo es el trasplante de médula ósea. Se detectó un único gen responsable que codifica para una proteína (perforina) con efectos citotóxicos. Nuestro objetivo es presentar las características clínicas e inmunológicas de un paciente con mutación en este gen. Se trata de un paciente varón, único hijo de padres no consanguíneos, sin antecedentes familiares, que presentó a los 18 meses mononucleosis infecciosa (VCA IgM (+) para EBV). Transcurridos 20 días comienza con fiebre persistente, mal estado general, hepatoesplenomegalia y pancitopenia. Se realiza punción aspirativa de médula ósea: franco aumento de histiocitos con imágenes de hemofagocitosis. Además hipertrigliceridemia, coagulopatía e hipofibrinogenemia. Inicia tratamiento con protocolo HLH-94 (etopósido, ciclosporina y corticoides) con remisión clínica y laboratorial. Reactiva su enfermedad en 2 oportunidades. En semana 23 del protocolo fallece por insuficiencia ventilatoria grave con poliadenopatías generalizadas. Por estudios de biología molecular se descarta mutación en el gen XLP (Síndrome linfoproliferativo ligado al X) y ante la sospecha de LHF se envía muestra a Francia. El análisis molecular (realizado por G de Saint Basile, Hospital Necker, París) detectó la presencia de 2 mutaciones (nonsense y missense) en el gen perforina, lo cual permitió dar consejo genético familiar.

278. (3828) SÍNDROME DE DELECCIÓN DEL CROMOSOMA 22Q11.2 (DEL 22Q): MANIFESTACIONES CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS. KRASOVEC, SILVIA; OLEASTRO, MATÍAS; ORNANI, ALICIA; OBREGÓN, GABRIELA; PEREZ, MIRIAM; GALLEGU, MARTA; ZELAZKO, MARTA

Inmunología, Hospital Garrahan Genética, H. Garrahan

El síndrome de del 22q asocia dismorfias faciales, cardiopatía congénita, hipocalcemia, anomalías del paladar e inmunodeficiencia en forma variable. Describimos manifestaciones clínicas e inmunológicas de 38 pacientes con del 22q (FISH). Agrupamos a los pacientes según N° de linfocitos CD3+ /mm³. Grupo I: <1500, corresponden al Síndrome de Di George (SDG) con compromiso inmunológico (criterios ESID/PAGID) ($n=11$); grupoll: >1500 y < del percentilo 25 para edad ($n=17$); y, grupo III: >Pc25 ($n=10$). Resultados: Todos los pacientes presentaron facie característica; ano-

malías cardíacas en 81% del grupo I, 82% del II y 50% del III; hipocalcemia en 70% grupo I versus 37 y 10 % grupos II y III respectivamente. El 73% del grupo I y 71% del II presentó infecciones severas y recurrentes, mientras que no fueron observadas en el grupo III. No se registraron deficiencias de inmunoglobulinas G, A y M en ninguno de los pacientes. Sólo 1/38 pacientes falleció por complicaciones posteriores a la cirugía cardiovascular. Conclusiones: Observamos baja incidencia de compromiso inmunológico severo en SDG. Se observan las características faciales como hallazgo constante. La cardiopatía no fue un hallazgo constante aún en pacientes con compromiso inmunológico. No se observó compromiso humoral. El criterio diagnóstico de 1500 LT establecido por ESID/PAGID no sería el indicador confiable para diferenciar el grado de susceptibilidad a infecciones.

279. (3834) UNA DISMINUCIÓN EN LA ELIMINACIÓN DE TIMOCITOS CD8+, MÁS QUE UN AUMENTO DE SU PRODUCCIÓN CONTRIBUYE AL INCREMENTO DE ESTA POBLACIÓN EN EL TIMO DE RATAS DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA. FELEDI, CATALINA ADRIANA; GOLDMAN, HEBE LEA; FRANCO, LILIANA GRACIELA; ROUX, MARIA ESTELA; MASSOUH, ERNESTO JORGE

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA Ciencias Biológicas, Farmacia y Bioquímica, UBA.

Durante el periodo de recuperación de las ratas desnutridas durante la lactancia, la alteración más significativa en el timo es el gran aumento de los linfocitos CD8b+simples positivos (sp), que persiste hasta los 4 meses de edad. Aunque a partir de los 50 días de vida el tamaño y el peso del timo se normalizan, en la población sp se observa una disminución del tamaño celular y de la fluorescencia específica para CD8b y CD4. Para determinar el origen de este desbalance, se analizaron los timocitos por citometría de flujo usando como marcadores dichos antígenos de superficie. Para apreciar la cinética del proceso, se calculó la relación, acumulada en el tiempo, entre el número de los timocitos más maduros respecto de los menos maduros del estadio anterior. Se pudo determinar que 1) El aumento del intermedario grande CD4-CD8b+brillante (LgCD4-CD8b+hi), originado a partir de las células grandes CD4-CD8- (dobles negativas) se produce más tarde en los D que en los N, y llega a valores mayores a los 70 días de edad (12 vs 2 veces). 2) El aumento de las células grandes CD4+CD8b+ (dobles positivas, DP) a partir de la expansión de las LgCD4-CD8b+hi es mayor en el D que en el N al cabo de cuatro meses (31vs19 veces). 3) La eliminación de los linfocitos medianos DP para dar spCD8b+ es significativamente menor ($p = 0.05$; Mann-Whitney U) entre los D frente a los N. Mientras los timocitos N decrecen 110 veces, los D disminuyen solo 29 veces en esta fase. Se concluye que la incapacidad del timo para eliminar de su médula a timocitos CD8b+ podría generar células T de repertorio alterado. Esta prolongada secuela que deja la desnutrición durante la lactancia queda enmascarada por la recuperación del tamaño y peso tímicos observada a partir de los 50 días de edad.

280. (3869) UTILIDAD CLINICA DE LOS ANTICUERPOS (ACS) ANTIENDOMISIO Y ANTITRANSGLUTAMINASA TISULAR HUMANA DE ISOTIPO IGG EN EL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDAD CELÍACA INFANTIL. CHOCLIN, CLARA ESTHER; CARABAJAL, PATRICIA; GINACA, ALEJANDRA

Inmunología Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez Inmunología. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Ciudad de Buenos Aires

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía sensible al gluten caracterizada por inflamación crónica de la mucosa intestinal. Se ha descrito la utilidad de los Acs antiendomisio (EMA), antitransglutaminasa tisular (TG) y antigliadina (AGA) de isotipo IgA en el diagnóstico de EC pero poco se conoce acerca de la utilidad de estos Acs de isotipo IgG. Nuestro objetivo fue evaluar la prevalencia de EMA-G y TG-G en pacientes pediátricos con EC

confirmada y determinar el valor diagnóstico de estos Acs. Material y métodos: Se estudiaron 54 sueros de pacientes pediátricos con IgA sérica normal para la edad. Se dividieron en: GRUPO I (n:30): pacientes con EC diagnosticada por biopsia de intestino delgado (BID): enteropatía severa, en dieta con gluten. Edad: 9meses a 16años (media: 5a 10m) 19 mujeres, 11 hombres. GRUPO II (n:24): pacientes con trastornos gastrointestinales no celíacos con BID normal, comparables en edad y sexo. Se determinó la presencia de EMA-A/G por IFI sobre tercio medio de esófago de mono; TG-A/G y AGA-A/G por ELISA (cut off 20U) y dosaje de IgA sérica por nefelometría. Resultados: GRUPO I: todos fueron EMA-A y TG-A + (100%); 25(83%) presentaron EMA-G; 11 (37%) TG-G; 23 (77%) AGA-A y 30 (100%) AGA-G. Título medio TG-A: 675U y TG-G: 35U. GRUPO II: ninguno presentó EMA-A/G ni TG-A/G; 4 (17%) fueron AGA-A + y 12 (50%) AGA-G. Especificidad: EMA-A/G, TG-A/G: 100%; AGA-A:83% y AGA-G:50%. Valor predictivo positivo EMA-A/G, TG-A/G: 100%; AGA-A: 85% y AGA-G:71%. Valor predictivo negativo EMA-A, TG-A y AGA-G: 100%; EMA-G: 83%, TG-G: 56% y AGA-A:74%. Los Acs del isotipo IgG muestran buena E para EC, pero baja S, sobre todo los TG-G, en títulos menores, siendo de menor utilidad diagnóstica que los de isotipo IgA, en pacientes con niveles normales de IgA sérica.

281. (3882) ANTICUERPOS (ACS) ANTIENDOMISIO (EMA), ANTITRANSGLUTAMINASA TISULAR HUMANA (TG) Y ANTIGLIADINA (AGA) DE ISOTIPO IGG EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON DEFICIENCIA DE IGA Y CON HIPO IGA. CHOCLIN, CLARA ESTHER; CARABAJAL, PATRICIA; VILLA, NÉLIDA; MAVROMATOPULOS, ELIZABETH; BEZRODNIK, LILIANA; GINACA, ALEJANDRA

Inmunología. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez Inmunología y Gastroenterología. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Ciudad de Buenos Aires.

La enfermedad celíaca (EC) es una intolerancia permanente al gluten que puede presentarse con diferentes formas clínicas o asintomática. La deficiencia de IgA es 10 a 15 veces más frecuente en pacientes con EC que en la población general pudiendo llevar a resultados falsos negativos en los test serológicos de isotipo IgA. Nuestro objetivo fue evaluar la frecuencia de EMA-G, TG-G y AGA-G en pacientes pediátricos con deficiencia de IgA y con hipo IgA. Material y métodos: Se estudiaron 91 sueros de niños que se dividieron en: GRUPO I (n:48): 34 pacientes con deficiencia selectiva de IgA (DSA) y 14 con DSA transitoria (IgA<8mg/dl), X edad: 7a (10meses a 19años) GRUPO II (n:43): pacientes con niveles de IgA sérica por debajo del límite inferior normal para la edad (hipo IgA), X edad: 4a (10meses a 14años) Se determinó la presencia de EMA-A/G por IFI en tercio medio de esófago de mono; TG-A/G y AGA-A/G por ELISA, dosaje de IgA sérica por nefelometría. Resultados: GRUPO I: 9 (19%) fueron EMA-G+, 10 (21%) TG-G+ y 36 (75%) AGA-G+. 8 presentaron los 3 Acs. simultáneamente y en 4 de ellos se confirmó el diagnóstico de EC por biopsia de intestino delgado (BID). 2 pacientes fueron TG-G+ en títulos bajos y EMA-G-. 4 pacientes con síntomas GI y EMA-G y TG-G- fueron BID normal. GRUPO II: 5 (12%) fueron EMA-G+; 5 (12%) TG-G+ y 27 (63%) AGA-G+. 3 pacientes tenían Acs isotipo IgA e IgG + (4; 10 y 14años, IgA: 22 -67mg/dl). 2 pacientes menores de 3 años (IgA: 10-21) solo mostraron Acs isotipo G, ambos con BID compatible con EC. En 4 niños con síntomas GI y EMA-G y TG-G- la BID fue normal. EMA-G y TG-G fueron hallados en el 20% de pacientes con DSA pudiendo servir como screening en el diagnóstico de EC. En niños con hipo IgA sería necesario realizar acs. de ambos isotipos.

282. (3929) PACIENTE CON INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA(IDCS) ASOCIADA A SINDROME DE CARTILAGO PELO (SPC). SU RECONSTITUCION LUEGO DE UN TRANPLANTE CON CELULAS DE CORDON. BEZRODNIK, LILIANA; GAILLARD, MARIA ISABEL; AVERSA, LUIS; FREIGEIRO, DANIEL; KUMINSKI, GUSTAVO

Htal Ricardo Gutierrez Unidad de Transplante A Fleming

El SCP es un desorden autosómico recesivo poco frecuente: miembros cortos condrodisplasia metafisial, pelo ralo, fino y escaso. Compromete en diferente grado el sistema inmune. El 1% puede presentar IDCS. Objetivo: comunicar la reconstitución inmunológica total luego del trasplante con células progenitoras de cordón (TCPC) en un paciente con IDCS. Material: pac. de sexo masc. con probable SCP e IDCS (T-/B+/NK+), funcionalidad NK normal, agamaglobulinemia; que recibe a los 24 meses un TCPC por no tener donante histoiéntico relacionado. Grupo 0+. Régimen condicionante: Busulfan, ciclofosfamida, GAL. Prevención injerto versus huésped (lvsH) Ciclosporina. Gamaglobulina endovenosa por deficiencia humoral. Donante sexo fem. grupo A+. Ambos CMV negativos. Métodos: Poblaciones linfocitarias CD3 CD4 CD8 CD56 CD20 CD45RA CD45RO. Dosajes de inmunoglobulinas. Valoración anticorpórea (antígenos proteicos y polisacáridos). Respuesta celular proliferativa a mitógenos y antígenos específicos. Resultados: Neutrófilos día +15, plaquetas día +21, día+60 Gr.A+ y citogenético 46XX. Buena respuesta proliferativa frente a diferentes mitógenos. A los 16 meses post TCPC suspende GEV. Respuesta a antígenos proteicos a los 20 meses y a polisacáridos a los 22. Actualmente niño de 3 años sin infecciones ni signos de (lvsH), buena calidad de vida Score Lanjky 100 Tabla (V.N:CD3:60-85,D4:36-46CD8:19-40CD20:7-23CD56:7-24 nd:no dato)

post meses	linfocitos mm3	CD3 %	CD4 %	CD8 %	CD20 %	CD56 %	CD3CD45RA
4	315	4	2	1	11	77	nd
12	2442	54	33	19	27	14	44
16	2378	51	33	18	28	14	nd

Conclusiones: El TCPC es una alternativa terapéutica útil en pacientes con IDCS sin donante histoiéntico relacionado

283. (3936) ASOCIACION ENTRE MUTACION DE STAT5B, RETRASO DE CRECIMIENTO, DEFECTO T (LT) Y NEUMONITIS INTERSTICIAL LINFOIDE (NIL). BEZRODNIK, LILIANA; GAILLARD, MARIA ISABEL; TEPPER, ALEJANDRO; HWA, VIVIAN; ROSENFELD, RON; HEINRICH, JUAN

Inmunología Htal R Gutiérrez Neumonología y Endocrinología Htal R. Gutiérrez; Dto. de Pediatría Universidad de Oregón

La Stat5b participa en la cascada de signos post receptor de la hormona de crecimiento (HC), así como en el camino de señalización de IL2, IL7, IL15, IL21 e INFg. OBJETIVO: comunicar la asociación de una mutación de Stat5b, trastornos del crecimiento y compromiso de LT. MATERIAL: paciente de sexo fem., con severo retraso de crecimiento sin respuesta a la HC, diagnóstico de NIL a los 7 años (inmunosupresión continua). MÉTODOS: poblaciones linfocitarias: CD3 CD4 CD8 CD56 CD20, dosajes de inmunoglobulinas (Ig), valoración anticorpórea (antígeno proteico y polisacárido). Rta. celular proliferativa a mitógenos. Cultivo de fibroblastos del paciente, padres y control. Inmunoblotting con anticuerpos específicos (Stat5a y b), análisis del DNA genómico y complementario. PCR y secuenciación del exón 15 de Stat5b, receptor HC y factor de crecimiento de insulina like (FCIL). RESULTADOS: La paciente presentó disminución de la población T global, con RCD4/CD8 conservada, Linfocitos B y NK normales. hipergamaglobulinemia, funcionalidad anticorpórea normal. Buena respuesta proliferativa en su primer evaluación y francamente disminuida luego de 10 años. Por inmunoblotting escasa detección de Stat5b con Stat5a normal. El tratamiento con HC no produjo fosforilación de Stat5 b. La secuenciación reveló una mutación missense homocigota (prolina por alanina en posición 630) A630P. Los padres (primos hermanos) fueron heterocigotas para la misma mutación. No se observó alteración del receptor de HC ni FCIL. Existe una relación estrecha entre la

mutación de Stat5b y el severo retraso de crecimiento debido a la anomalía molecular postreceptor en el camino de señalización de la HC. Teniendo en cuenta el rol que Stat5b juega en el subconjunto de genes de citoquinas que son necesarias para la homeostasis T, este defecto podría impactar en el deterioro T progresivo y ser la causa del disturbio disregulatorio cuya expresión clínica fue el NIL en nuestra paciente.

284. (3940) SÍNDROME DE HIPER-IGM: MANIFESTACIONES CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS. GOMEZ RACCIO, ANDREA CECILIA; KRASOVEC, SILVIA; ORNANI, ALICIA; DANIELIAN, SILVIA; ZELAZKO, MARTA; OLEASTRO, MATÍAS

Hosp. Garrahan

El Síndrome de Hiper-IgM abarca un grupo heterogéneo de entidades caracterizadas por niveles normales o elevados de IgM y disminuidos de IgG e IgA. Objetivo: presentar las características clínicas, de laboratorio y hallazgos moleculares de pacientes con síndrome de hiper-IgM. Material y Métodos: se analizaron retrospectivamente las historias clínicas de 8 pac. (6 varones y 2 mujeres). Resultados: la primera manifestación clínica fue en el primer semestre de vida en los varones y después de los dos años en las mujeres. En todos los casos correspondió a infecciones respiratorias. La edad media al diagnóstico fue 5 a 3 m (r: 8 m-17 a 5m). El tiempo medio de seguimiento fue de 8 años (r: 4a-13 a 5 m) En la evolución, 6 pac. presentaron infecciones respiratorias altas y bajas (1 por *Pneumocystis carinii*), 1 pac. meningoencefalitis progresiva idiopática, 1 pac. hipertrofia ganglionar, 1 pac. anemia aplásica inducida por Parvovirus y otro neutropenia persistente. Ninguno presentó diarrea por *Cryptosporidium* ni colangitis esclerosante. Sólo falleció el paciente con compromiso neurológico. La media de IgM al diagnóstico fue 583 mg/dl (r: 116-2040), correspondiendo en 7 casos a valores superiores a 1 DS. En 4/6 se observó respuesta de tipo IgG a antígenos proteicos. El estudio molecular identificó la mutación en el gen de CD40L en 4/8 y en el gen de AID en 3/8 pac. Conclusiones: el diagnóstico de síndrome de hiper-IgM fue tardío en relación al inicio de las manifestaciones clínicas. Observamos pocas manifestaciones infecciosas características del síndrome. En algunos pacientes estaría conservada la capacidad de formación de anticuerpos. Destacamos al estudio molecular como herramienta categórica para definir el diagnóstico y el asesoramiento familiar.

285. (4009) EXPRESION DE CD40L EN INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS (IDP). SARDAÑONS, JESSICA; GAILLARD, MARIA ISABEL; BEZRODNIK, LILIANA

Inmunología Hospital de Niños

El sistema CD40-Ligando juega un rol importante en la cooperación T-B siendo uno de los caminos necesarios para realizar el switch de Inmunoglobulinas. Su compromiso en diversas deficiencias primarias está descrito. OBJETIVO: Observar la expresión de CD40-L en IDP, exceptuando síndrome de Hiper IgM Ligado al X. Correlacionarla con características clínicas, fenotípicas y funcionales. MATERIALES: 10 Deficiencias selectivas de Ig A (DSIgA) (4-12a), 6 inmunodeficiencia común variable (IDCV)(1-38a), 1 Deficiencia celular no clasificada (DCnC)(6a). MÉTODOS: Poblaciones Linfocitarias, Dosajes de inmunoglobulinas, respuesta anticorpórea (antígenos proteicos y polisacáridos), respuesta celular proliferativa a mitógenos, expresión de CD40-L en células T CD4 activadas (análisis por citometría de flujo). RESULTADOS: 10/10 DSIgA presentaron RCD4/CD8 normal y expresión de CD40L: 59+/-17 (VR:60+/-11.8). Las IDCV se dividieron en dos grupos: A) 3/6: < de 10 años, RCD4/CD8: <0.6, baja expresión de CD40L: 11, 18 y 21% y alta morbilidad. 2/3 severa hipogama B) 3/6: > de 15 años, RCD4/CD8 normal, buena expresión de CD40L: 67, 78 y 99% y manifestaciones clínicas tardías. 3/3 hipogama <2DS. Rta alterada a polisacáridos El paciente con DCnC presentó RCD4/CD8 <0.6, baja expresión de CD40L: 13%, respuesta proliferativa alterada

y dosajes de inmunoglobulinas normal, con compromiso clínico severo. No se encontró relación directa entre expresión de CD40L y respuesta proliferativa de células T en los grupos estudiados. La expresión de CD40L permitió clasificar nuestras IDCV en dos grupos. La baja expresión de CD40L (grupo A) se relacionó con disminución de la población T CD4, manifestaciones clínicas tempranas y mayor morbilidad. En el paciente con DCnC, el patrón de CD40L, CD4 y clínica fue similar al grupo A, sin presentar el mismo compromiso humoral. La alteración de la vía CD40-CD40L esta descripta en IDP, si bien la implicancia de la expresión de CD40L en la fisiopatogenia de las mismas aún no es clara.

CARDIOLOGÍA III

286. (3365) EFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES Y LA CASTRACION SOBRE LA REPOLARIZACION VENTRICULAR CARDIACA. BERTRÁN, GUILLERMO; ARINI, PEDRO; BIAGETTI, MARCELO; QUINTEIRO, RICARDO; VALVERDE, ESTEBAN.

Laboratorio de Electrofisiología; Departamento de Fisiología; Universidad Favaloro

Es bien conocida la influencia de las hormonas sexuales sobre la repolarización ventricular (RV) cardíaca. El objetivo de este trabajo es evaluar los efectos de dichas hormonas y de la castración sobre la misma. En este trabajo evaluamos los parámetros de la RV en el electrocardiograma (ECG) y en los potenciales de acción (PA), en conejos jóvenes machos y hembras (MJ y HJ), adultos machos y hembras (MA y HA) y adultos castrados machos y hembras (MC y HC). En las variables del ECG, encontramos que los individuos jóvenes de ambos sexos presentan valores significativamente menores con respecto a los individuos adultos (normales y castrados) en el intervalo QT fin (QTf), el intervalo JT pico (JTp) y el intervalo JT fin (JTf).

	HJ	HA	HC	MJ	MA	MC
QTf	58.5±1.7*	67.9±1.9	65.5±2.2	47.9±1.2 [†]	52.6±1.9	58.3±1.5
JTf	203.8±2.3*	160.8±2.3	171.5±2.8	196.7±1.5*	144.4±2.3	151.4±2.6
JTp	145.2±2.9*	92.9±2.2	103.7±2.6	148.9±1.2 [†]	90.6±2.3	93.1±2.8

Valores en mseg. Media±SEM. * p<0.05 vs HA y HC. [†] p<0.05 vs MA y MC.

En cuanto a los PA, los MA presentan valores significativamente mas cortos que los MJ al 30 y 50% de la RV (DPA30 y 50), mientras que las HA presentan una RV al 90% (DPA90) significativamente mas larga que la de las HJ. Los HC y MC presentan valores intermedios.

	HJ	HA	HC	MJ	MA	MC
DPA30	104.3±3.3	107.4±3.8	104.6±4.7	103.8±4.1 [†]	83.9±4.2	90.9±5.9
DPA50	132.8±2.8	139.5±3.6	130.3±5.9	133.1±4.5 [†]	110.1±4.1	117.2±6.7
DPA90	169.0±2.4*	195.9±4.8	179.4±4.8	175.9±4.2	170.3±2.8	171.8±5.8

Valores en mseg. Media±SEM. * p<0.05 vs HA. [†] p<0.05 vs MA.

Conclusiones: Existen claras diferencias en las variables del ECG entre los individuos jóvenes y los adultos, las cuales se mantienen luego de la castración. Con respecto a los PA, mientras que las hormonas masculinas acortan el comienzo de la RV (DPA30 y 50), las hormonas femeninas prolongan el final de la RV (DPA90). Esto estaría sugiriendo un efecto diferencial de ambas hormonas sobre las corrientes que controlan la duración de los PA.

287. (3474) EFECTO FARMACOLÓGICO DEL CELECOXIB SOBRE HIPERFIBRINOGENEMIAS INDUCIDAS EN RATAS. MOYA, MONICA; CAMPANA, VILMA; GAVOTTO, ANTONIO; TARAN, MARIANA; SIMES, JUAN; SPITALE, LUIS; PALMA, JOSE

Cátedra de Física Biomédica

El proceso aterogénico presenta similitudes con enfermedades inflamatorias cuya base fisiopatológica está regulada por mediadores proinflamatorios. Hiperfibrinogenemia (FP) es marcadora de lesiones compatibles con aterogénesis. Se estudió el efecto farmacológico del celecoxib, inhibidor específico de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), sobre la hiperfibrinogenemia en ratas sometidas a injurias múltiples (IM), por laparotomías (Lx) (lotes II y III) en un período de 60 días (1Lx/2semanas). Al lote III se administró 0.05mg/oral/rata/día de celecoxib, inmediatamente después de la 2ª cirugía y durante 45 días. La sangre se obtuvo a las 72 hs de la última Lx en todos los IM. FP (mg/dl) se dosó por espectrofotometría. Se observó un incremento estadística-mente significativo de FP comparando el lote (II) (358,7 ± 9,9) con el control (I) (207.0 ± 3.0) (p<0.001). Similar comportamiento se observó al comparar el lote (II) con el (III) (220.8 ± 2,9) (p<0.001). En el lote III, FP disminuyó a valores controles, observando diferencia significativa al compararlo con IM solamente (II) (p<0.001). Celecoxib disminuye los niveles de FP por inhibición de COX-2 que impide la biosíntesis de prostaglandinas, y bloquearía la liberación de citoquinas proinflamatorias, ambas vías mediadoras de la síntesis y secreción de FP. Este efecto farmacológico disminuiría la inflamación vascular, mejoraría la disponibilidad de óxido nítrico y así reduciría la progresión de la aterosclerosis, tal como se observa en los IM x 60 ds. + celecoxib, pero conservando la producción de prostacilinas I2 (PGI2) a nivel endotelial, potente inhibidor de la adhesividad plaquetaria pues no bloquea la Cox-1.

288. (3524) INFLUENCIA DE PARÁMETROS HEMORREOLÓGICOS EN PACIENTES HIPERTENSOS CON DAÑO DE ÓRGANO BLANCO. D'ARRIGO, MABEL; FORESTO, PATRICIA; BARBERENA, LILIANA; FILIPPINI, FERNANDO; GALLO, ROBERTO; RACCA, LILIANA; RASIA, RODOLFO; VALVERDE, JUANA

Fac. de Cs. Bioq. y Farm. U.N.R. Dpto de Bioq. Clínica, Fc. de Cs. Bioq. y Farm. Clín. Méd. Fac. Cs. Médicas U.N.R. CONICET. Rosario

El riesgo de daño relacionado con hipertensión puede ser analizado, evaluando parámetros hemorreológicos. Las alteraciones hemorreológicas involucran cambios en parámetros hemodinámicos, que contribuyen al daño del órgano (cardíaco, cerebral, renal). El objetivo de este trabajo fue estudiar parámetros hemorreológicos (viscosidad sanguínea y agregación y morfología eritrocitaria) en pacientes con hipertensión arterial (HT) con daño de órgano blanco, comparados con un grupo control normotenso (NT). Se estudiaron 15 pacientes hipertensos con daño de órgano blanco (156 ± 3 - 101 ± 2 mmHg), y 25 NT (120 ± 2 - 78 ± 2 mmHg). La viscosidad plasmática (VP) y de sangre entera (VSE), se midió con un viscosímetro rotacional. Se calcularon las viscosidades relativas (VR), por el cociente entre VSE y VP y a partir de ésta, se estimó la rigidez eritrocitaria (Tk), aplicando la ecuación de Taylor. La agregación y morfología se estudiaron por observación microscópica, determinando un parámetro de forma de los agregados (ASP) y un índice de morfología eritrocitaria (EMI). Resultados: HT = ASP 0.65±0.10, VR 4,60seg⁻¹ 4.43±0.31, VR 230seg⁻¹ 3.83±0.29, Tk 1.02±0.12, EMI 0.91±0.05; NT ASP 0.28±0.15, VR 4,60seg⁻¹ 3.28±0.25, VR 230seg⁻¹ 2.63±0.42, Tk 0.82±0.10, EMI 2.13±0.15. Test de Mann-Whitney p<0.01. La viscosidad de la sangre a bajas SR depende de la agregabilidad eritrocitaria, mientras que a altas SR (> 180 seg⁻¹), de la deformabilidad eritrocitaria. Cambios en el perfil de viscosidad, típicos de hipertensión, jugarían un papel importante en las alteraciones de flujo a nivel de la microcirculación. Tales alteraciones, podrían ser secundarias al incremento de las fuerzas de corte dentro del árbol vascular y ser las responsables de la aparición de daño de órgano blanco. Desde el punto de vista clínico, el perfil hemorreológico permitiría estimar un factor de riesgo adicional en el desarrollo de daño de órgano blanco en el paciente hipertenso.

289. (3587) EL 5-HIDROXIDECANOICO (HD) NO REVIERTE LOS EFECTOS CITOPROTECTORES Y METABÓLICOS DEL DIAZÓXIDO (DZ) EN CORAZONES DE RATAS ALI-

MENTADAS Y AYUNADAS SOMETIDOS A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN. MARINA PRENDES, MARÍA GABRIELA; GARCÍA, GIMENA; FERNÁNDEZ, ALEJANDRA; PERAZZO, JUAN CARLOS; SAVINO, ENRIQUE; VARELA, ALICIA

Facultad de Farmacia y Bioquímica Cátedras de Fisiología y de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA e IQUIMEFA-CONICET.

El DZ (10 μ M), abridor de los canales mitocondriales de potasio sensibles al ATP (K-ATPm) mejora la recuperación funcional y preserva la viabilidad celular de corazones perfundidos Langendorff sometidos a isquemia global (I) 25 min-reperfusion (RP) 30 min, provenientes de ratas alimentadas (AL) o ayunadas (AY) 24 h. Los efectos son más manifiestos en AL, en los que inhibe la glucólisis durante la I, sin modificar la glucogenólisis. El HD, que bloquea los canales K-ATPm, revierte la protección funcional del DZ. El objetivo fue investigar si el HD afecta las acciones metabólicas y citoprotectoras del DZ. Para ello se midió el contenido tisular de glucógeno (n=6) y de lactato (n=6) y se midió el porcentaje de viabilidad celular (%VC) con el método del trifeniltetrazolilo y morfometría computarizada (n=5). La estadística se hizo con ANOVA. El HD 100 μ M y el DZ fueron agregados al medio de perfusión 15 y 10 min antes de la I, respectivamente. El HD no afectó el lactato tisular al finalizar la I en AL tratadas con DZ (90,87 \pm 9,02 vs 104,76 \pm 12,47 μ mol/g seco) pero lo disminuyó en AY (53,47 \pm 5,74 vs 106,39 \pm 15,67 p<0,01) pero no modificó el contenido de glucógeno en ninguno de los grupos tratados con DZ (AY: 51,48 \pm 12,38 vs 69,61 \pm 13,73, AL: 85,68 \pm 22,16 vs 58,19 \pm 10,04 μ g/100mg seco) y tampoco modificó la preservación de la VC ejercida por el DZ (%VC: AY: 55,05 \pm 9,87 vs 57,97 \pm 4,2, AL: 55,02 \pm 4,25 vs 56,33 \pm 6,19). Se concluye que el bloqueo de los canales K-ATPm no produce abolición de los efectos citoprotectores y metabólicos del abridor, sugiriendo la existencia de otros mecanismos implicados en dichas acciones. La parcial metabolización del HD en los corazones que poseen activada la lipólisis, como ocurre en el ayuno, podría explicar el efecto reductor de la glucólisis en AY.

290. (3666) BAJOS NIVELES DE 6-SULFATOXIMELATONINA URINARIA EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA CONGESTIVA SEVERA. GIROTTI, LUIS; LAGO, MANUEL; IANOVSKY, OSCAR; ELIZARI, MARCELO V.; DINI, ANDRÉS; PEREZ-LLORET, SANTIAGO; ALBORNOZ, LILIANA E.; CARDINALI, DANIEL P.

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

La melatonina está involucrada principalmente en la regulación de los ritmos biológicos. Recientemente se ha demostrado que ejerce un efecto regulatorio sobre el estado contráctil de la vasculatura. Si bien este efecto podría tener significado en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), hasta ahora no ha sido evaluada la producción de melatonina en este grupo de pacientes. Para esto se determinó la concentración de 6-sulfatoximelatonina (6-SM) urinaria (metabolito de la hormona considerado buen índice de su producción) mediante RIA en 33 pacientes hospitalizados por ICC y en 146 controles ambulatorios. Los resultados fueron expresados en μ g de 6-SM excretados entre las 1800 h y 0600 h del día siguiente. Los datos fueron analizados con el test de Mann-Whitney y con regresión lineal. Se observó que la excreción de 6-SM urinaria estaba disminuida en los pacientes con respecto a los controles (mediana: 2.6 vs. 6.02 μ g, p<0.0001, Mann-Whitney). Esta disminución fue observada independientemente de la medicación con beta-bloqueantes o benzodiazepinas. Sin embargo se encontró una relación inversa entre la edad y la excreción de 6-SM. El análisis de regresión multivariada mostró que sólo la edad y el grupo (control vs. ICC) predijo el nivel de 6-SM urinaria (r(2)[ajustado] = 0.179, F[2,176] = 20.41, p< 0.001). No se hallaron diferencias significativas en los niveles de 6-SM en relación con el tiempo de evolución de la ICC (agudos vs. crónicos, mediana 2.76 μ g vs 1.66 μ g, respectivamente,

p=0.2, Mann-Whitney). Estos resultados indican que la síntesis de melatonina está disminuida en pacientes con ICC. Tal disminución podría contribuir a agravar la enfermedad de base.

291. (3730) EL LOSARTAN REDUCE LA HIPERTROFIA COMPENSADORA DE LOS MIOCITOS POST-INFARTO DE MIOCARDIO EN CONEJO. PÉREZ, SUSANA; GONZÁLEZ, GERMÁN; MASUCCI, ALEJANDRO; GELPI, RICARDO J; MORALES, CELINA

Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA

La hipertrofia compensadora de los miocitos (HCM) en zonas alejadas (ZA) al infarto de miocardio (IM) interviene en el remodelamiento ventricular. Sin embargo, no se estudió el efecto del bloqueo de los receptores AT1 de la angiotensina II sobre dicha HCM post-infarto. Objetivo: Evaluar morfológicamente el efecto del bloqueo de los receptores AT1 de la angiotensina II sobre la HCM en zonas alejadas al IM. Material y Métodos: Se utilizaron 16 conejos neozelandeses separados en 4 grupos: dos grupos con ligadura de una rama prominente de la arteria coronaria izquierda: G1, IM tratado con losartan (L) 12.5 mg/kg/día durante 35 días post-IM (n=4) y G2, IM sin losartan (n=4). Dos grupos sham: G3, con losartan (n=4) y G4, sin losartan (n=4). Todos los animales fueron sacrificados a los 35 días post-cirugía. Los corazones fijados en formol se cortaron de punta a base. Se colorearon con H-E y tricrómico de Masson. Se realizaron mediciones morfológicas para tamaño de IM (TIM, %), y para evaluar el diámetro y área de los miocitos en ZA (septum, S1) al IM. Se evaluaron 70 miocitos en cada corte de corazón. Resultados: (X \pm SEM): El TIM promedio entre los grupos fue 25.1 \pm 3.8%. *p<0.05vs G1.

	G1	G2	G3	G4
Diámetro	13.37 \pm 0.28	18.50 \pm 0.51*	14.51 \pm 0.26	15.61 \pm 0.61
Área	165.74 \pm 5.02	212.47 \pm 8.91*	154.3 \pm 3.45	161.1 \pm 4.84

En nuestras condiciones experimentales se observó un aumento del tamaño transversal de los miocitos en G2, que fue abolido por el losartan. El bloqueo de los receptores AT1 de la angiotensina II sería un factor determinante en la falta de crecimiento de los miocitos. Estos datos sugieren que la angiotensina II estimula no sólo la hipertrofia de los miocitos en las patologías globales sino también en las regionales, como es el infarto de miocardio.

292. (3831) EFECTOS DE LA DIABETES SOBRE LA GLUCÓLISIS Y EL CONTENIDO DE GLUCÓGENO EN CORAZONES DE RATAS SOMETIDOS A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN (I-R). TESTONI, GUSTAVO; LIVORE, VERÓNICA; GASTALDI, MARÍA JULIETA; KIRCHHEIMER, CAROLINA; ASTUDILLA, CHRISTIAN; VÁZQUEZ, NANCY; PÉREZ, MARÍA JULIA; VARELA, ALICIA; SAVINO, ENRIQUE

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA e IQUIMEFA - CONICET

En modelos experimentales de corazón perfundido de rata diabética el miocardio es más resistente al daño producido por la isquemia-reperfusion. En trabajos anteriores lo hemos verificado en ratas diabéticas con 3, 6, 8 y 10 semanas de evolución. El objetivo de la presente investigación fue evaluar si dicha resistencia se correlaciona con la acumulación de lactato durante la isquemia o con los depósitos de glucógeno tisulares. Ratas Wistar (200 a 250 g) fueron tratadas con estreptozotocina 50 mg/kg iv y los controles con vehículo. A las 3 semanas los corazones fueron perfundidos según Langendorff con Krebs-bicarbonato glucosa 10 mM, estimulados a 300 por minuto. Luego de la estabilización se los sometió a 35 min de I y 30 min de R. Se registraron la presión desarrollada ventricular izquierda (PDVI), la presión diastólica final (PDF) y +/-dP/dT máximas. Por métodos enzimáticos se midieron el lactato tisular antes y después a la I

y el glucógeno tisular en los mismos tiempos y al finalizar la R. En todos los casos n=6 excepto para el glucógeno n=5. La estadística se hizo con ANOVA. Se observó mejor recuperación funcional durante la R en los corazones de ratas diabéticas (PDVI: 92,27±6,21 vs 58±12,20% p<0,01; +dP/dT: 116,50±19,27 vs 66,5±8,72% p<0,01, -dP/dT: 112,50±14,82 vs 67,17±7,44% p<0,01 a los 30 min de R y PDF: 0±0 vs 14,5±8,21% p<0,05 a los 20 min de R). No hubo diferencias en la acumulación de lactato tisular durante la I (57,64±10,29 vs 57,39±9,71 µmol/g[ps]) ni en los niveles de glucógeno pre y post isquemia. Durante la R sólo los controles resintetizaron los depósitos de glucógeno (351,11±108,10 vs 53,26±13,00 mg/100 mg[ps] p<0,01). Se concluye que la mayor resistencia a la isquemia de los corazones diabéticos no se correlaciona con una menor acumulación de lactato durante la isquemia ni con los contenidos de glucógeno previos o posteriores a la misma.

293. (3848) NUEVO TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA CARDÍACA: CARDIOIMPLANTE DE MIOBLASTOS AUTÓLOGOS (CMA). INFORME DE CASOS. MIELNICHUK, ALEJANDRA; ROGERS, MARÍA FLORENCIA; ROLDÁN, FERNANDO GUSTAVO; LAGO, NOEMÍ; GENOVESE, JORGE ARNALDO

Laboratorio Craveri S.A.I.C

ANTECEDENTES: El infarto agudo de miocardio (IAM) lleva a la pérdida de cardiomiocitos funcionales, careciendo el tejido muscular cardíaco de células capaces de reponerlo. El trasplante intramiocárdico de células de músculo esquelético crecidas en cultivo (mioblastos) del propio paciente, ha surgido como una terapia alternativa para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Nos propusimos estandarizar el cultivo de mioblastos para luego realizar implantes autólogos en cuatro pacientes con insuficiencia cardíaca severa y así evaluar la factibilidad de este procedimiento. **MÉTODOS:** Se obtuvieron biopsias de músculo vasto lateral. Se procesaron y amplificaron en cultivo con suero autólogo hasta obtener 200-300 millones de células. Se caracterizaron por su capacidad de formar miotúbulos, IFI antidesmarina y fueron cuantificadas por citometría de flujo con anticuerpo CD56+. El análisis de motilidad segmentaria se realizó por ecografía con armónicas y color kinesis. El score de motilidad se estableció según la Asociación Americana de Ecocardiografía. **RESULTADOS:** El porcentaje de mioblastos obtenidos fue en promedio del 60%. A continuación se muestran los parámetros clínicos transcurridos 6-8 meses desde el implante: Ninguno de los cuatro pacientes tuvo complicaciones. No hubo arritmias ni óbitos.

Parámetros	Pre-implante	Pos-implante
Clase funcional	2.2±0.5	1.0±0.0
Fración de eyección %	33±15.6	36±12
Diámetro diastólico de ventrículo izquierdo (mm)	64±6.5	60.1±4.2

El CMA ha demostrado ser una técnica novedosa y prometedora en el funcionamiento de la función cardíaca pos-infarto. Los datos preliminares observados en los pacientes indican la factibilidad y seguridad de la técnica.

294. (3974) EFECTOS DE LA INCUBACIÓN "IN VITRO" CON FRUCTOSA SOBRE LA PRODUCCIÓN VASCULAR DE PROSTANOIDES. MAYER, MARCOS; PUYO, ANA; RODRIGUEZ FERMEPIN, MARTIN; GRINSPON, DIANA; PEREDO, HORACIO

Cátedras de Biología Celular, Fisiopatología y Farmacotecnia I, Fac de Farmacia y Bioquímica, UBA.

En la rata, una dieta rica en fructosa (F) produce hipertensión arterial (HTA) acompañada de alteraciones metabólicas. En trabajos previos demostramos modificaciones en la producción vascular de prostanoideos (PR) en este modelo. Nuestro objetivo fue estudiar "in vitro" el efecto directo de la presencia de F

40 mM en el medio de incubación sobre la producción y liberación de PR. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho. La aorta (A) y el lecho mesentérico (LM) se incubaron en Krebs (Grupo control = C) o Krebs con F 40 mM (Grupo F) 60 min. a 37°C. En el medio de incubación se midieron por HPLC los PR liberados. Se determinaron prostaglandinas (PG: ng/mg de tejido, X ± ES) F2 a y E2, así como PG 6-ceto F1 a y tromboxano (TX) B2, metabolitos estables de prostaciclina (PGI2) y TXA2, respectivamente. En A la incubación con F disminuyó la PGI2 (C, 192.4 ± 19.9, n=6, vs. F, 93.9 ± 10.2, n=4, p<0.02). En LM la incubación con F disminuyó la PGI2 (C, 96.4 ± 12.5, n=7, vs. F, 30.6 ± 8.8, n=4, p<0.01) y la PGE2 (C, 87.4 ± 13.3, n=7, vs. F, 33.9 ± 12.2, n=4, p<0.01). En conclusión, la incubación con F redujo la liberación de prostaciclina, una PG vasodilatadora, tanto en A como en LM; así como la de PGE2, también vasodilatadora, en LM. Por lo tanto, la disminución de la liberación de PR vasodilatadores sin modificar la de los vasoconstrictores, como PGF2 a y TX, inducida por la F provocaría un desequilibrio entre ambos grupos favoreciendo la vasoconstricción, con lo que se incrementaría la resistencia periférica, causante de la HTA moderada observada en los animales tratados con sobrecarga de F.

295. (3979) HIPERTENSIÓN ARTERIAL INDUCIDA POR SOBRECARGA DE FRUCTOSA EN LA RATA: AUMENTO EN LA CAPTACIÓN DE NORADRENALINA EN EL HIPOTÁLAMO ANTERIOR. MAYER MARCOS, RODRIGUEZ FERMEPIN MARTÍN, CAVALLERO SUSANA, PEREDO HORACIO, LEVIN GLORIA, FERNÁNDEZ BELISARIO, PUYÓ ANA.

Cátedras de Biología Celular, Fisiopatología y Farmacotecnia I, Fac de Farmacia y Bioquímica, UBA.

La sobrecarga dietaria de hidratos de carbono induce hipertensión arterial (HTA) en la rata. En particular la sobrecarga de fructosa (F) produce hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia e HTA, modelo asimilable al Síndrome X humano. Se ha postulado que una activación del sistema nervioso simpático producida por la modificación dietaria intervendría en el desarrollo de dichas alteraciones. El objetivo del presente trabajo fue analizar el papel de la neurotransmisión simpática a nivel hipotalámico en la etiopatogenia de la HTA producida por sobrecarga de F. Ratas Sprague Dawley macho (Grupo F) fueron alimentadas con una dieta estándar y una solución de F (10% P/V) para beber durante 4 semanas; mientras que el Grupo control (C) recibió la misma dieta y agua de bebida. Al final del tratamiento se registró la presión arterial (PA: mmHg, X ± ES) sistólica por método indirecto (F, 132 ± 2, n=6, vs. C, 108 ± 4, n=6, p< 0.001). Posteriormente se realizaron experimentos "in vitro" de captación de 3H-noradrenalina (NA) en el hipotálamo anterior y posterior. La captación neuronal basal de NA (dpm/µg proteína, X ± ES) en el hipotálamo anterior fue mayor en el Grupo F que en el Grupo C (F, 3.41 ± 0.32, n=10, vs. C, 1.97 ± 0.49, n=9, p<0.03). No se encontraron diferencias en la captación de NA en el hipotálamo posterior entre ambos grupos (F, 2.86 ± 0.53, n=9, vs. C, 3.01 ± 1.07, n=11, NS). Estos hallazgos muestran que aumenta la captación presináptica de NA en el hipotálamo anterior, en el que predominan los núcleos simpato-inhibitorios. Esta alteración provocaría una desinhibición a nivel de los núcleos bulbo-medulares simpáticos con la consecuente elevación de la PA por aumento del tono simpático.

296. (4019) RELACION ANG II-DOPAMINA RENAL: EFECTOS DEL PEPTIDO SOBRE LA PKA Y LA ACTIVIDAD DE LA COMT Y LA NA+, K+ ATPASA RENAL. CHOI, MARCELO ROBERTO; CORREA, ALICIA; VALERA, MARIA SOLEDAD; GIRONACCI, MARIELA; PEÑA, CLARA; FERNANDEZ, BELISARIO

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA Cátedra de Química Biológica I, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Hemos descrito que la angiotensina II (ANG) disminuye la captación in vitro de 3H-Dopamina (DA) en cortes de corteza renal externa de ratas Sprague Dawley, a través del receptor AT1 (inhibido por Losartán 10 μ M). El análogo 8Br-AMPC 125 μ M reprodujo sus acciones, pero no la neomicina 1mM ni los medios privados de calcio, descartándose la participación del IP3 y los canales cálcicos. Se continuó investigando la proteína quinasa (PK) involucrada y los efectos sobre la Na⁺, K⁺ATPasa y la COMT. El H89 2 μ M (inhibidor de PKA) revirtió los efectos de la ANG II 100 nM sobre la captación renal de DA (dpm/g.105 \pm SEM) Control (C; n=10): 6.42 \pm 0.19; H89 (n=6): 6.61 \pm 0.42; ANG II (n=8): 5.33 \pm 0.23*; H89+ANG II (n=5): 6.96 \pm 0.30; *p<0.05 vs control. La ANG II 100 nM revirtió el incremento de la captación de DA producido por el factor natriurético atrial (ANF) 100 nM: C (n=8): 6.42 \pm 0.18; ANF (n=7): 7.53 \pm 0.06*; ANG II (n=6): 5.03 \pm 0.14*; ANF+ANG II (n=9): 6.68 \pm 0.23; *p<0.05 vs control. En presencia del inhibidor de la síntesis de DA, carbidopa 100 μ M, la ANG II 100 nM aumentó la actividad de la Na⁺, K⁺ATPasa (μ moles/mg prot/min \pm SEM): C (n=4): 0.34 \pm 0.02; carbidopa (n=4): 0.57 \pm 0.06 p<0.05 vs control; DA 1 μ M+carbidopa (n=8): 0.50 \pm 0.01 p<0.05 vs control; DA+ANG II+carbidopa (n=5): 0.62 \pm 0.04 p<0.05 vs DA+carbidopa. La actividad de la COMT disminuyó en presencia de ANG II (pmoles/mg prot/min): C (n=8): 0.32 \pm 0.01; ANG II (n=5): 0.11 \pm 0.02 p<0.001 vs control. Estadísticas: ANOVA-Tukey-Kramer y Student t-test. Los resultados muestran que la PKA señala los efectos renales de la ANG sobre la DA y que parte de sus efectos antinatriuréticos indirectos se median a través de la disminución de la captación de DA renal, activando la Na⁺, K⁺ATPasa y antagonizando los efectos del ANF.

ENDOCRINOLOGIA Y REPRODUCCION VIII

297. (3230) EL ETANOL INHIBE LA ACUMULACIÓN DE AMP CÍCLICO Y LA LIBERACIÓN HIPOTALÁMICA DE LHRH ACTIVANDO RECEPTORES CANABINOIDEOS EN RATAS MACHO. FERNANDEZ-SOLARI, JAVIER; SCORTICATI, CAMILA; MOHN, CLAUDIA; VISSIO, PAULA; DE LAURENTIIS, ANDREA; PRESTIFILIPPO, JUAN PABLO; MCCANN, SAMUEL M; RETTORI, VALERIA

CEFYBO-CONICET CEFYBO-CONICET, Buenos Aires, Argentina; Pennington Biomedical Research Center, Baton Rouge, LA, USA

Los endocannabinoides como la anandamida (AEA) actúan sobre receptores cannabinoides tipo 1 (CB1) pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteína G cuya activación provoca la inhibición de la adenilato ciclasa (AC). La forskolina (FRSK) activa la AC y el AMPc media la liberación de LHRH del hipotálamo medio basal (HMB). En trabajos previos, demostramos que los cannabinoides y el etanol (EtOH) inhiben la liberación de LHRH. Los objetivos del presente trabajo fueron investigar: 1) si el EtOH actúa vía receptores CB1 en el HMB, 2) si AEA y EtOH utilizan los mismos mediadores para inhibir la liberación de LHRH. Grupos de 5-6 HMB extraídos de ratas Wistar macho fueron preincubados 15 min en Krebs Ringer y luego incubados 15 min con diferentes drogas; 1) Control; 2) FRSK (76 μ M); 3) FRSK + AEA (1 nM); 4) FRSK + AEA + AM251 (10 μ M, un antagonista específico de CB1); 5) FRSK + EtOH (100 mM); 6) FRSK + EtOH + AM251; 7) AM251. El contenido de AMPc en el tejido (fmoles/HMB \pm SEM) y la liberación de LHRH al medio (pg/HMB \pm SEM) fueron medidos por RIA. La acumulación de AMPc incrementada por FRSK (de 127.0 \pm 18.0 a 342.5 \pm 85.1, p<0.01) fue bloqueada significativamente tanto por AEA (153.1 \pm 26.7, p<0.01) como por EtOH (116.5 \pm 27.9, p<0.01). AM251 revirtió completamente este bloqueo en ambos casos (469.5 \pm 65.0, p<0.001 y 325.7 \pm 82.4 p<0.01, respectivamente) mientras que AM251 sólo no tuvo efecto. La liberación de LHRH estimulada por FRSK (de 6.8 \pm 1.4 a 44.7 \pm 11.7) fue completamente bloqueada por AEA (8.7 \pm 1.2, p<0.001) y EtOH (10.4 \pm 1.4, p<0.01). AM251 revirtió solo parcialmente esta inhibición en ambos casos (24.2 \pm 11.5 y 25.0 \pm 6.3,

respectivamente) Los resultados demuestran que el EtOH, al igual que los endocannabinoides, inhibe la acumulación de AMPc actuando vía receptores CB1. La inhibición de la liberación de LHRH por AEA y EtOH también estaría mediada al menos en parte por estos receptores

298. (3236) EFECTOS DE LA DENERVACIÓN HIPOTALÁMICA POR GLUTAMATO MONOSÓDICO Y DE UNA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE LA POBLACIÓN TIROPOTA. CAMIHORT, GISELA AMELIA; LUNA, GEORGINA; FERRESE, CELIA; GOMEZ DUMM, CESAR; SPINEDI, EDUARDO; CONSOLE, GLORIA

Cat. "B" de Histología y Embriología - Facultad de Ciencias Médicas - U.N.L.P. Instituto Multidisciplinario de Biología Celular. IMBICE (CONICET-CICPBA)

Se ha detectado la influencia de la leptina en la secreción de las hormonas hipofisarias, hallándose que actuaría como reguladora del eje hipotálamo-pituitario-tiroideo. El glutamato monosódico (MSG) induce daño neuronal hipotalámico con alteraciones neuroendocrinas, obesidad, degeneración óptica e hipogonadismo. Se investigaron los cambios inmunohistoquímicos morfológicos de la población tirotrópica en un modelo experimental de obesidad. Ratas hembras 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-TSH-EnVision (Dako)-DAB. Se registraron los parámetros estereológicos mediante videomicroscopía (Optimas). Densidad de volumen (DV), densidad de células (DC) y tamaño celular (TC) presentaron aumento significativo * (p<0.05) en el grupo MSG con dieta normal, mientras que con DH sin MSG se halló descenso significativo * (p<0.05) de DV y TC, con incremento de DV y TC en DH con MSG.

	Dieta normal (DN)	Dieta normal (DN)	Dieta hiperlipídica (DH)	Dieta hiperlipídica (DH)
TSH	sin MSG	con MSG	sin MSG	con MSG
DV (x10 ⁻²)	5.7 \pm 0.5	14.0 \pm 1.3*	4.1 \pm 0.5*	9.3 \pm 1.5*
DC (x10 ⁻⁴)	12.5 \pm 0.9	21.4 \pm 1.5*	11.1 \pm 0.9	15.7 \pm 1.2
TC (μ m ²)	45.4 \pm 2.5	69.0 \pm 7.8*	35.0 \pm 2.7*	59.5 \pm 7.8*

Concluyendo, MSG con DN ocasiona hipertrofia-hiperplasia tirotrópica, mientras que DH sin MSG marca descenso de dichos parámetros.

299. (3537) IDENTIFICACION DEL RECEPTOR DE HORMONAS TIROIDEAS (RT) EN EPIDIDIMOS DE RATAS EN DIFERENTES ESTADOS FUNCIONALES TIROIDEOS. DE PAUL, ANA; MUKDSI, JORGE; *DEL RIO, ALBERTO; *PALAORO, LA; *NIEPOMNISZCZE, HUGO; **PELLIZAS, CLAUDIA; **COLEONI, ALDO; TORRES, ALICIA

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. *Dpto. Bioq. Clínica, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA. **Dpto. Bioq. Clínica. Fac. Cs. Químicas, UNC.

INTRODUCCIÓN: Trabajos previos, han demostrado que las hormonas tiroideas ejercen un efecto directo sobre el epidídimo de rata, demostrándose sitios de unión de alta afinidad para T3. Este hallazgo sugirió investigar la localización inmunocitoquímica (ICQ) de los receptores de la hormona tiroidea en epitelio epididimario de ratas con diferentes condiciones de función tiroidea. MATERIALES Y MÉTODOS: Se usaron ratas adultas controles (C), eutiroides (E) tratadas con radioyodo y luego con 2,5 ug de T4/día, hipertiroides (He) con sobredosis (10ug deT4/día) e hipotiroides (Ho) por administración ip de 270 uCi de (131)I. A los 30d se extrajeron los epidídimos. Se realizó ICQ a nivel de microscopía fotónica y electrónica de RTAalfa1-beta1 en tejido epididimario de los diferentes grupos. Se empleó hígado como control positivo para RTalfa1-beta

1. RESULTADOS: En todos los grupos analizados, por ICQ a nivel fotónico, las células epiteliales epididimarias mostraron positividad preferentemente citoplasmática para RTalfa1-beta 1, mientras que la localización del receptor en núcleo fue escasa. Sin embargo, en ratas Ho se destacó una mayor proporción de células inmunomarcadas tanto a nivel citoplasmático como nuclear. La ultraestructura confirmó la presencia de RTalfa1-beta 1, en citoplasma y núcleo de células epiteliales de epidídimo. En células hepáticas de ratas normales se constató la presencia del RT predominantemente a nivel nuclear. La localización a nivel ultraestructural de RTalfa1-beta 1 en el epitelio epididimario confirma el efecto directo de las hormonas tiroideas sobre este tejido. La intensidad de la inmunomarcación del receptor varió en los modelos analizados, dependiendo del grado de funcionamiento tiroideo. El hallazgo de una alta densidad de RT en el compartimiento citoplasmático en relación al nuclear es un hallazgo diferencial de las células del epidídimo y cuya significación funcional se desconoce.

300. (3561) DETECCIÓN DE ACTIVIDAD TELOMERASA EN PUNCIÓNES BIOPSIAS ASPIRATIVAS DE NÓDULOS TIROIDEOS. GUERRA, LILIANA NOEMI; BECHARA, YAMILA; MOIGUER, SILVIA; KARNER, MIRTA; BURDMAN, JOSE A.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Hospital Israelita, UAI

La identificación de un marcador tumoral que ayude a distinguir entre nódulos tiroideos benignos y malignos es de gran relevancia, dado que hasta un 30% de las punciones biopsias aspirativas realizadas son sospechosas o indeterminadas. En nuestro Servicio de Endocrinología estudiamos la validez de la actividad de telomerasa como marcador de malignidad en el cáncer de tiroides. Determinamos la telomerasa, mediante un ensayo de TRAP cuantitativo, en 65 muestras provenientes de biopsias aspirativas de nódulos tiroideos. El ensayo fue realizado a doble ciego y, con posterioridad los resultados fueron comparados con exámenes citológicos del material en estudio. Solo 10 muestras fueron positivas para la actividad telomerasa. El rango de valores obtenido fue entre 3.4 a 133.4 Unidades. Sin embargo, 3 muestras positivas para telomerasa (con valor de actividad menor a 10 unidades) no correlacionaron con citología maligna o dudosa. Estos 3 pacientes no fueron intervenidos. En concordancia con datos de otros grupos, observamos que existe un nivel de corte para la actividad telomerasa, que en nuestro caso es 10 Unidades. Considerando este valor de corte, las 7 muestras restantes eran positivas. Luego de la cirugía comprobamos que estas 7 muestras con actividad telomerasa mayor a 10 unidades eran malignas (3 carcinomas papilares, 2 foliculares, 1 anaplásico y un carcinoma a células de Hurtle). Cuatro de estas muestras fueron informadas como malignas por citología y tres como indeterminadas. Ninguna de las 55 muestras telomerasa negativa presentaron células malignas en la punción. Ninguno de estos pacientes fueron intervenidos. Aunque todavía esta en discusión la real utilidad de este marcador, consideramos que la utilización de esta determinación en conjunto con el estudio citológico y otros marcadores, sería de utilidad en el diagnóstico del cáncer de tiroides.

301. (3577) VITAMINA C Y METABOLISMO OXIDATIVO EN EL HIPERTIROIDISMO. MILER, ELIANA A.; RIOS DE MOLINA, MA. DEL CARMEN; ROSSI, LUCAS; BURDMAN, JOSE A.; GUERRA, LILIANA N.

Depto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA HOSPITAL ISRAELITA

Recientemente mostramos que una mezcla antioxidante que contiene vitamina C disminuye los niveles de malondialdehído (MDA) y la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en pacientes hipertiroideos. Para estudiar la relación hormona tiroidea y metabolismo oxidativo determinamos: actividad SOD y catalasa, niveles de MDA y proteínas oxidadas, en la línea humana Hep 2.

En función de datos previos obtenidos en el laboratorio, dosis de 20 nM de T3 y/o de 100 mg/l de vitamina C fueron incluidas en el cultivo. Los tiempos de tratamiento fueron desde 1 hasta 24 horas. Después de 1 hr. con T3 se observa un incremento significativo de MDA comparado con controles tratados con vehículo (vehículo: 26 ± 4 , T3: 57 ± 5 nmol MDA/mg proteína, $p < 0.01$). El tratamiento en conjunto T3 y Vitamina C provoca una disminución significativa de MDA a las 3hs (T3: 96 ± 8 T3 y VitC: 65 ± 5 nmol MDA/ mg prot $p < 0.05$). Los niveles de MDA disminuyen a mayor tiempo. Los niveles de proteínas oxidadas aumentan un 60% luego del tratamiento con T3. La actividad SOD aumenta significativamente a las 3 hs de tratamiento con T3 (vehículo: $1,97 \pm 0,44$, T3: $10,0 \pm 0,6$ U/mg prot $p < 0.01$). La vitamina C no afecta esta actividad ($8,3 \pm 0,5$ U/mg prot). La actividad de catalasa no se modifica significativamente con T3 o con el tratamiento conjunto (vehículo: $1,9 \pm 0,3$, T3: $1,4 \pm 0,2$, T3 y VitC: 1.1 ± 0.1 $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ prot). Vitamina C agregada al cultivo no produce cambios en la actividad enzimática de SOD o catalasa. Dosis mayores de 200 nM de T3 provocan lisis celular; ensayos realizados con el reactivo de Hoechst mostraron un pequeño porcentaje de células en apoptosis. Concluimos que la T3 produciría un efecto rápido induciendo estrés oxidativo y, como consecuencia oxidación lipídica y proteica. La SOD se induciría rápidamente luego del tratamiento hormonal. Los niveles de MDA son regulados por vitamina C y por el sistema antioxidante celular endógeno. Estos resultados apoyarían observaciones previas sobre el beneficio de los antioxidantes en el tratamiento del hipertiroidismo.

302. (3684) EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA GH-IGF EN OVARIOS DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA. HAPON, MARIA BELEN; GAMARRA LUQUES, CARLOS D; JAHN, GRACIELA A.

Laboratorio de Reproduccion y Lactancia, IMBECU CONICET C

En la mujer el hipotiroidismo (hipoT) se asocia frecuentemente con atraso en la pubertad, anovulación, amenorrea o hipermenorrea, irregularidades menstruales, infertilidad y con abortos espontáneos. Recientemente encontramos que el hipoT (inducido por el antitiroideo propiltiouracilo, PTU) produce calda de GH en el proestro y aumentos en PRL y estrógenos en el estro, seguidos de irregularidad de los ciclos sexuales en ratas vírgenes y un menor número de crías por camada en ratas madres. El IGF1 se produce localmente en el ovario, participa en la diferenciación folicular preovulatoria y es estimulado por FSH y GH. IGFBP 3, 4 y 5 son producidas en el ovario y regulan la acción de IGF1. Estudiamos la acción del hipoT (inducido por PTU 0,01 en el agua de bebida) sobre la expresión de RNAm (medida por RT-PCR semicuantitativo y expresada en función de S16), de IGF1 y sus proteínas de unión, el receptor de GH (GHR) y el de Prolactina largo (PRLR), durante el segundo ciclo estral en ratas vírgenes. Estudiamos los días diestro1 20 hs (D1), diestro 2 20 hs (D2), proestro 8hs (O8hs), 20 hs (O20 hs), estro 8 hs (E8hs) y 20 hs (E20hs). Los controles (Co) bebieron agua. No hubo cambios en la expresión de IGF1. El IGFBP3 disminuyó en las hipoT en D1 0.253 ± 0.073 vs. Co: 0.705 ± 0.122 y D2: 0.016 ± 0.015 vs. Co: 0.479 ± 0.125 y aumentó en O8hs: 3.009 ± 0.106 vs. Co: 2.258 ± 0.130 . IGFBP5 disminuyó en D1: 0.020 ± 0.012 vs. Co: 0.603 ± 0.153 . PRLR disminuyó en D1: 0.214 ± 0.057 vs. Co: 0.708 ± 0.1 . GHR aumentó en O20hs: 1.639 ± 0.253 vs. Co: 0.804 ± 0.135 . Durante el proestro el aumento en la expresión del GHR en ovario compensaría a la disminución de la secreción de GH producida por el hipoT, resultando en una expresión normal de IGF1 y valores de BP-3 y BP-5, que posibilitarían una ovulación normal en ratas hipoT.

303. (3725) DAÑO POR IRRADIACIÓN Y REPARACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS TIROIDEAS TUMORALES. GUERRERO, N; THOMASZ, L; DAGROSA, A; VIAGGI, M; KRAWIEC, L; DADDINO, A; PISAREV, M; JUVENAL, G

Bioquímica Nuclear, CNEA, Fac. Medicina, UBA.

Poco se sabe sobre el daño al ADN y mecanismos de reparación en el cáncer de tiroides. El objetivo de este trabajo fue medir el daño y un sistema de reparación (NER) en células tiroideas con diferente grado de malignidad. Se emplearon cultivos primarios de adenomas y carcinomas diferenciados humanos, y las líneas NPA y ARO (carcinoma papilar y anaplásico humano respectivamente). Las células fueron irradiadas con UV (9, 17.5, 35, 70 y 140 J/m(2)) t=0. Se amplificó por PCR la secuencia Alu que forma dímeros de timinas al ser irradiadas. En caso de que haya daño la replicación se detiene, dando productos de menor tamaño (entre ellos una banda de 104 pb). Se analizó el contenido de este producto mediante electroforesis, autoradiografía y análisis densitométrico. Por otra parte se midió la viabilidad celular y la captación de deoxiglucosa. Los cultivos primarios mostraron menor daño a su ADN, la línea NPA sufrió un daño intermedio y la línea ARO fue la más dañada. El % de daño fue significativo ($p < 0.05$ o menor) para el cult. primario a la 0 (20%) y 8 horas (20%) para la dosis de 140 J/m(2); para NPA a la 0 (27%), 8 (21%) y 24 horas (21%) para la dosis de 140 J/m(2) y para ARO a las 0 (35 J/m(2): 20%, 70 J/m(2): 29%, 140 J/m(2): 74%), 8 (70 J/m(2): 22%, 140 J/m(2): 62%) y 24 horas (70 J/m(2): 21% y 140 J/m(2): 64%) En cuanto a la reparación, las células ARO no son capaces de reparar significativamente aún luego de 24 horas. Los otros tipos celulares no repararon significativamente aunque esto puede deberse a que el daño sufrido no ha sido de importancia. El efecto de UV sobre la viabilidad celular mostró mayor daño a medida que aumenta el grado de indiferenciación. En % respecto a células no irradiadas: C: 93, 84 y 78 (*) para 35, 70 y 140 J/m2 respectivamente, 80, 58 (*) y 50 (*) para NPA y 82, 60 (*) y 18 (*) para ARO (*) ($p < 0.05$ o menor). La captación de (3)H-DOG se correlacionó con la viabilidad celular. El daño celular se correlacionó con el grado de malignidad de las células.

304. (3735) EFECTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO SOBRE LA TRIGLICERIDEMIA DE LA RATA. INCHAUSPE, GABRIEL; RIGALLI, ALFREDO; PUCHE, RODOLFO C.

Facultad de Medicina UNR Cátedra de Química Biológica. Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Medicina. U. N. Rosario

La administración intravenosa (iv) de 2 ug de hormona de crecimiento (GH) a ratas, produce aumento de la trigliceridemia (TAG). El efecto es independiente del contenido graso de la ingesta previa. Se utilizaron ratas hembras línea IIM/Fm, sublínea "m" de 200 g, ayunadas durante 24 hs., que se anestesiaron con 120 mg de uretano/100 g de peso. La perfusión de intestino aislado demostró aumento de los triacilglicérols en la vena porta, después de la administración de GH. Este fenómeno fue inhibido por co-perfusión con genisteína (inhibidor de tirosin-kinasa). Estos resultados indican al intestino como asiento de la acción de la GH, pero no excluyen otros tejidos. En experimentos adicionales se anuló la circulación hepática por ligamiento del tronco celíaco y la vena porta. Después de obtener 2-3 muestras basales de sangre se inyectaron 0,5 ml de solución salina conteniendo 2 ug de GH. Cuarenta y cinco minutos más tarde se realizó laparotomía abdominal, se anuló la circulación hepática y se continuaron las observaciones por otro lapso semejante. Se obtuvieron muestras de sangre de la arteria femoral cada 15 minutos. El grupo control fue sometido a las mismas manipulaciones sin GH. Se calculó la tasa de modificación de la concentración de TAG (TM, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) Antes de GH la TM no discrepa de cero (-3.248 ± 4.849). Luego de inyectar la hormona $\text{TM} = 3.841 \pm 1.771$ ($P < 0.05$), que no se modificó al anular la circulación hepática ($\text{TM} = 3.856 \pm 1.909$; $P < 0.05$). Los animales controles no modificaron la concentración de TAG a lo largo del experimento ($\text{TM} = 0.03116 \pm 0.5099$). Se concluye que la inyección de 2 ug de GH produce incremento de los TAG que no se deben a aumento en la absorción intestinal ni a la síntesis hepática. Se presume que se estimula la síntesis a partir de precursores.

305. (3760) EL HIPERTIROIDISMO MODULA LA EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE ADIPOCITOS EN GLÁN-

DULA MAMARIA DE RATAS EN EL DÍA 14 DE LACTANCIA. CECI, LAURA; VARAS, SILVIA; JAHN, GRACIELA; GIMÉNEZ, SOFIA

Lab. Bioquímica Molecular. UNSL Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU (CRICYT), CONICET.

El hipertiroidismo (HT) inducido por T4 (0.010mg/100g. de peso corporal. sc) produce una disminución del contenido de triglicéridos y colesterol libre (CL) asociado con aumento de la síntesis de CL en glándula mamaria (GM) de ratas en el día 14 de lactancia, L14, (Varas et al. Lipids. 2001 36:801). Adicionalmente, en este día de lactancia se observó un estado de involución mamaria precoz con expresión de distintas proteínas pro- y anti-apoptóticas (Varas et al. Reproduction 2002 124: 691). El objetivo de nuestro trabajo es estudiar el efecto del HT sobre la expresión y regulación de distintas enzimas responsables de la síntesis de lípidos durante el proceso precoz de involución. Se midieron los niveles de RNA por RT-PCR semicuantitativa de los siguientes genes: FAS, ACC, LPL, TNFalfa, aP2, SRBP1c, ACO, CPT-1 y HMG-CoA Reductasa. Los valores fueron normalizados en relación al gen control de beta-actina. Los valores son expresados como la media \pm SEM. El HT produjo una disminución de la expresión de TNFalfa (HT: 0.36 ± 0.08 , Co: 0.89 ± 0.19), aP2 (HT: 2.03 ± 0.11 , Co: 2.45 ± 0.13) y de SRBP 1c (HT: 1.08 ± 0.06 , Co: 1.50 ± 0.06). No se observaron diferencias significativas en la expresión génica de las demás enzimas analizadas. En tejido adiposo aP2, TNFalfa y LPL son marcadores de adipocitos. La caída de aP2 genera una cascada transcripcional que produce la diferenciación a adipocitos maduros. Así mismo TNF alfa produce una inhibición de la expresión de PPARgamma y C/EBPalfa. Nuestros resultados podrían sugerir un estímulo de la adipogénesis en forma prematura en glándula mamaria de ratas hipertiroides lo que estaría asociado a los procesos de precoz involución observadas en estos animales.

306. (3908) ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN EL DESARROLLO LUTEAL MURINO. BARREIRO ARCOS, MARÍA LAURA; LUCHETTI, CAROLINA; CREMASCHI, GRACIELA; MOTTA, ALICIA

CEFYO-CONICET Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA

El cuerpo lúteo (CL) funcional produce progesterona (P4), la que disminuye durante la luteólisis, momento en que aumenta el nivel de prostaglandina (PG) F2 alfa. El CL en involución produce un aumento de especies reactivas de oxígeno que inducen la peroxidación lipídica de la membrana plasmática. Se ha comprobado la presencia de receptores específicos para hormonas tiroideas (HT) a nivel ovárico que modularían la función reproductiva. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de las HT sobre la funcionalidad del CL. Para ello se indujo la formación de CLs funcionales por inyección de gonadotropina coriónica (15 UI) en ratones hembras BALB/c prepúberes. Los explantes ováricos obtenidos 7 días post-inyección fueron cultivados por 24 hs en presencia de concentraciones crecientes de Triiodotironina (T3) o Tiroxina (T4). En el sobrenadante se dosó la producción de P4, PGF2 alfa y PGE por radioinmunoensayos específicos. Las HT disminuyeron los niveles de PGE (% de inhibición -%INH-: T4 10(-6) M, $47.8 \pm 5.0\%$; T3 10(-7) M, $45.3 \pm 3.1\%$, $p < 0.05$) y de P4 (%INH: T4, $41.7 \pm 4.3\%$; T3, $70.3 \pm 3.6\%$, $p < 0.05$), sin modificar significativamente la producción de PGF2 alfa (pg /mg de tejido: B, 525 ± 42 vs. T4, 452 ± 34 y T3, 478 ± 48). Las HT incrementaron la peroxidación lipídica del tejido ovárico, valorada por cuantificación de malondialdehído formado (nM/mg de tejido: B, 0.39 ± 0.07 vs T4, 2.24 ± 0.11 y T3, 1.55 ± 0.14 , $p < 0.01$). Esto fue acompañado por la presencia de células con morfología nuclear apoptótica en cortes ováricos teñidos con Hoescht. Concluimos que las HT afectan la funcionalidad del CL, reflejada en la producción disminuida de P4, disminuyen la producción de PGE, de conocido efecto anti-apoptótico, e incrementan el índice de lipoperoxidación, lo que contribuiría a

la apoptosis del tejido ovárico. El presente trabajo ha sido subsidiado por el Programa Regional de Capacitación en Salud Sexual y Reproductiva para Latinoamérica y el Caribe (ICMER).

ENDOCRINOLOGIA Y REPRODUCCION IX

307. (3253) NIVELES DE LEPTINA Y SU INFLUENCIA SOBRE LAS MMPS EN PLACENTA Y FETOS DE RATAS SANAS Y DIABÉTICAS. PUSTOVRH, CAROLINA; JAWERBAUM, ALICIA; WHITE, VERÓNICA; CAPOBIANCO, EVANGELINA; GONZÁLEZ, ELIDA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos

La leptina es un importante regulador del gasto energético. Sus niveles se incrementan a lo largo de la gesta, en parte debido a la producción placentaria. Nuestros resultados previos muestran que las metaloproteasas (MMPs), enzimas que participan en el proceso de remodelación tisular, presentan niveles elevados en la placenta diabética. Con el objeto de evaluar si la producción de leptina se encuentra alterada durante la maduración placentaria y la morfogénesis fetal de animales diabéticos, se analizaron los niveles de leptina y su posible acción moduladora sobre las MMPs. En tejido fetal y placentario de ratas (día 13.5 de gesta) sanas (C) y diabéticas por administración neonatal de estreptozotocina (D) se evalúa: 1) El efecto de leptina sobre la actividad gelatinásica (zimografía) de estos tejidos, incubados 60 min. en medio Krebs. 2) Los niveles tisulares de leptina (ELISA). Resultados: los niveles de leptina (ng/mg) están disminuidos en la placenta (D 0.4 ± 0.03 v C 0.6 ± 0.09 , $p < 0.05$) y en el feto de madre diabética (D 0.2 ± 0.03 v C 0.5 ± 0.09 ; $p < 0.02$). Adiciones de leptina (2-50 mM) disminuyen la actividad de MMP9 (62%, $p < 0.01$) y no de MMP2 en placentas C, mientras que inhiben la actividad de ambas MMPs en placentas D (MMP2 69% $p < 0.01$, MMP9 67% $p < 0.01$). Este efecto regulador también se observa en el feto C y D, donde leptina (50 mM) reduce la actividad MMP2 (C:72 % $p < 0.01$; D: 81% $p < 0.05$). Se concluye que durante la placentación la leptina modula negativamente la actividad de MMPs en tejido placentario y fetal. La disminución en los niveles de leptina en las placentas y fetos de ratas diabéticas podría estar relacionada con los niveles alterados de MMPs que afectan el desarrollo y maduración feto-placentario en esta patología.

308. (3705) CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL (RA): COMPARACIÓN DEL EFECTO DE N-ACETILGLUCOSAMINA (GLCNAC) EN ESPERMATOZOIDES DE HAMSTER INCUBADOS EN MEDIOS CON CALCIO (CA) O ESTRONCIO (SR). ZITTA, KARINA; WERTHEIMER, EVA; MIRANDA, PATRICIA V.

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Los espermatozoides de mamífero deben capacitarse y sufrir la RA para poder fertilizar a un ovocito. Este proceso exocitótico ocurre fisiológicamente sobre la zona pelúcida (ZP) pero en el hámster también ocurre de manera espontánea una vez completada la capacitación. Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que el Sr es capaz de reemplazar al Ca en la capacitación. En este trabajo, quisimos analizar algunas de las características de los espermatozoides capacitados en medio con Sr. Para ello, los espermatozoides fueron incubados en medio TALP común o modificado (TALPm), en el cual el Ca fue reemplazado por Sr. Luego de 3 hs, los espermatozoides fueron incubados con los ovocitos en medio con Ca o Sr y se observó la RA en células motiles unidas a la ZP. Cuando se utilizó Sr en toda la incubación, los espermatozoides no fueron capaces de sufrir la RA sobre la ZP (8 ± 2 vs 84 ± 5 % RA en Sr y Ca respectivamente). Cuando a los espermatozoides capacitados en Sr se les agregó el Ca en el medio de incubación con los ovocitos, se obtuvieron resultados iguales al control (84 ± 8 vs 84 ± 5 RA para Sr y control, respectivamente). Cuando se analizó el efecto de la GlcNAC sobre

espermatozoides incubados en ambos medios, se observó que la presencia de este monosacárido durante el periodo de capacitación (0-2,5 hs de incubación), inhibe la ocurrencia posterior de la RA espontánea (32 ± 10 vs 4 ± 2 % RA para Ca y Sr respectivamente, $p < 0.05$ vs 85 ± 2 % para el control). Cuando la GlcNAC fue agregada por 30 min después de la capacitación, la inhibición de la RA espontánea fue reversible en las células incubadas en Sr pero no en aquellas incubadas en Ca (81 ± 4 vs 46 ± 10 % RA a las 6 hs, $*; p < 0.05$ vs. control = 84 ± 3). Estos resultados indicarían que los espermatozoides capacitados en medio con Sr son similares pero no equivalentes a aquellos incubados con Ca. Esto sugiere que el Sr no sería capaz de reemplazar al Ca en todos los eventos relacionados con la capacitación.

309. (3706) SITIOS DE UNIÓN PARA N-ACETILGLUCOSAMINA (GLCNAC) EN ESPERMATOZOIDES DE HÁMSTER MEDIAN LA UNIÓN PRIMARIA A LA ZONA PELÚCIDA. WERTHEIMER, EVA; ZITTA, KARINA; MIRANDA, PATRICIA V.

Instituto de Biología y Medicina Experimental

La zona pelúcida (ZP) es una malla de glicoproteínas que recubre al ovocito de mamífero. Los procesos de interacción que ocurren durante la fertilización están mediados por los azúcares terminales de la ZP y proteínas unidoras de carbohidratos en el espermatozoide. Previamente reportamos que la GlcNAC inhibe la reacción acrosomal (RA) espontánea de los espermatozoides de hámster y su unión a la ZP. En este trabajo, quisimos analizar el mecanismo de acción de este azúcar. Para ello, se realizaron ensayos de unión y fertilización in vitro (FIV) en medio con estroncio (Sr) o calcio (Ca) respectivamente y se analizó el efecto del tratamiento de ambas gametas con el azúcar en diferentes condiciones sobre la unión a la ZP y la fertilización. Cuando las gametas fueron pre-incubadas en medio con Sr con GlcNAC, solo el tratamiento de los espermatozoides pudo repetir el efecto inhibitorio en la unión (67 ± 4 vs 25 ± 8 % de inhibición para la pre-incubación de espermatozoides y ovocitos respectivamente, $*; p < 0.05$ vs 0). Este resultado solo se obtuvo al utilizar concentraciones de azúcares mayores (10 mM) a las efectivas durante la co-incubación (1 mM). Estos espermatozoides fueron capaces de revertir el efecto inhibitorio en la RA espontánea al ser colocados en un medio completo (81 ± 4 vs 89 ± 2 % RA vs control). La GlcNAC fue también capaz de inhibir la FIV en una magnitud mayor a la observada en la unión (92 ± 8 vs 38 ± 6 % de inhibición para FIV y unión respectivamente, $p < 0.05$). Por otro lado, este efecto no se reprodujo cuando el azúcar estuvo presente luego de la unión de los espermatozoides a la ZP (35 ± 20 % inhibición, $p > 0.1$ vs 0). Estos resultados sugieren que la GlcNAC se estaría asociando a un sitio de unión presente en la superficie del espermatozoide que media la unión primaria de los mismos a la ZP.

310. (3763) EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS PRO-APOPTÓTICAS FAS Y FASL EN EL TEJIDO ENDOMETRIAL DE PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS (EDT) TRATADAS CON ANTICONCEPTIVOS ORALES COMBINADOS (AOC). MERESMAN, GABRIELA; BILOTAS, MARIELA; BARAÑO, ROSA INÉS; AUGÉ, LUIS; LOMBARDI, EDUARDO; SUELDO, CARLOS; TESONE, MARTA

Instituto de Biología y Medicina Experimental Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER)

Los AOC se utilizan como opción terapéutica para el tratamiento de la EDT. Anteriormente hemos observado que la administración de AOC a pacientes con EDT, revertía la disminución e inducía la apoptosis endometrial. Siendo así, el objetivo de este trabajo fue investigar el rol del sistema Fas-FasL en la regulación de la apoptosis endometrial en respuesta al tratamiento con AOC. MATERIALES Y MÉTODOS: Se evaluaron 13 pacientes con EDT y 13 mujeres controles (C) que se sometieron a laparoscopias

diagnósticas. Se tomaron biopsias de endometrio a todas las mujeres durante la fase proliferativa tardía, y a las pacientes luego de 30 días de administración de AOC. Se realizaron cortes histológicos y se evaluó la expresión de las proteínas Fas y FasL por inmunohistoquímica. Se cuantificó mediante el cálculo del Hscore que deriva de la suma de porcentajes de células teñidas para cada intensidad de tinción. En cada porta-objetos se evaluaron 10 áreas identificando la fracción epitelial y estromal por separado. RESULTADOS: Niveles de Fas: en la fracción epitelial, 254 ± 22 en C vs. 153 ± 13 en EDT ($p < 0.05$) y 298 ± 34 post tratamiento con AOC (PT) ($p < 0.001$ vs. EDT). En la fracción estromal, 208 ± 14 en C vs. 150 ± 10 en EDT ($p < 0.01$) y 323 ± 7 en PT ($p < 0.001$ vs. EDT). Niveles de FasL: en la fracción epitelial, 265 ± 22 y 174 ± 21 para tejido endometrial C y de EDT respectivamente ($p < 0.05$) y 315 ± 34 PT ($p < 0.01$ vs. EDT). En la fracción estromal, 244 ± 14 en C vs. 161 ± 12 en EDT ($p < 0.05$) y 333 ± 48 en PT ($p < 0.001$ vs. EDT). Hemos observado una reducción de la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Fas y FasL en el endometrio de las pacientes con EDT. Los AOC revierten esta disminución, induciendo la expresión de Fas y de FasL. Estos resultados insinúan un rol del sistema Fas-FasL en la regulación del crecimiento del tejido endometrial de las pacientes con EDT y en la respuesta al tratamiento con AOC.

311. (3788) INDUCCIÓN DEL DESARROLLO FOLICULAR E INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS MEDIANTE LA INYECCIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) EN OVARIO DE RATÓN. KOPCOW, LAURA; QUINTANA, RAMIRO; VIGHI, SUSANA; SUELDO, CARLOS; BARAÑO, ROSA INÉS

IBYME-CONICET Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER) e IBYME-CONICET, Bs. As., Argentina.

La angiogénesis perifolicular está directamente asociada con el desarrollo de los folículos ováricos. Considerando que la mayor vascularización podría mejorar la respuesta a la hiperestimulación ovárica, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inyección intraovárica de VEGF sobre la angiogénesis, la maduración de folículos, y la apoptosis en ratones. Se emplearon 24 ratones hembras de la cepa Balb/c de 8 semanas de edad, divididos en los siguientes grupos: Control (C) ($n = 7$). Hiperestimulado (HE) ($n = 10$) estimuladas en estro con 7,5 UI de PMCG ip. y a las 48 horas con 10 UI de hCG (ip). Luego de 2 horas se sacrificaron. VEGF (V) ($n = 8$) inyectadas con 0,1 ml de VEGF (2 $\mu\text{g/ml}$) en cada ovario y luego de 15 días sacrificadas. V+HE ($n=9$) inyectadas con VEGF en cada ovario, a los 13 días tratadas como las HE. En cada grupo se analizó el número de folículos antrales y luteinizados, vasos totales y la expresión de Bcl-2 en células foliculares y estromales. Los resultados se analizaron por Student "t" test y por ANOVA. Los resultados obtenidos fueron: N° de folículos antrales: C: $6,00 \pm 0,93$, HE: $11,57 \pm 0,72$ ($p < 0,005$ vs C), V: $16,00 \pm 2,54$ ($p < 0,05$ vs C), y V+HE: $14,75 \pm 1,88$ ($p < 0,01$ vs C). N° de folículos luteinizados: C: $2,00 \pm 0,61$, HE: $3,13 \pm 0,21$ (N.S.), V: $4,40 \pm 0,96$ (N.S.), y V+HE: $4,40 \pm 0,96$ ($p < 0,028$ vs C). N° de vasos totales: C: $5,00 \pm 0,55$, HE: $18,50 \pm 2,11$ ($p < 0,0005$ vs C), V: $20,00 \pm 4,89$ ($p < 0,05$ vs C), y V+HE: $22,22 \pm 1,23$ ($p < 2 \times 10^{-6}$ vs C). Expresión de Bcl-2 folicular: C: 0, HE: $3,75 \pm 1,08$ ($p < 0,014$ vs C), V: $14,00 \pm 4,40$ ($p < 0,014$ vs C), y V+HE: $8,00 \pm 1,74$ ($p < 0,0025$ vs C). Expresión de Bcl-2 estromal: C: 0, HE: $13,38 \pm 2,33$ ($p < 0,001$ vs C), V: $2,00 \pm 0,46$ ($p < 0,03$ vs C.), y V+HE: $17,75 \pm 6,30$ ($p < 0,05$ vs C). Estos resultados sugieren que la regulación de la angiogénesis mediante la administración directa de VEGF, sería un factor importante en el desarrollo de folículos antrales al mismo tiempo que se reduce la apoptosis en ovario.

312. (3798) ESTUDIO DE MEDIADORES INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES EN UN MODELO DE ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (OAE). THEAS, SUSANA; RIVAL, CLAUDIA; LUSTIG, LIVIA

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. UBA.

En la OAE, las células germinales (CG) mueren por apoptosis y se descaman de los túbulos seminíferos (ts). Previamente hemos demostrado, que las CG apoptóticas expresan FasR y TNFR1, sugiriendo que los sistemas FasR/FasL y TNFa/TNFR1 estarían involucrados en dicho proceso. El objetivo de este trabajo fue determinar la participación in vitro del sistema FasR/FasL en la apoptosis de las CG y estudiar los mecanismos intracelulares de la apoptosis en la OAE. La viabilidad de las CG de ratas normales disminuyó luego de 24h de incubación en presencia de distintas concentraciones de un anticuerpo agonista del FasR (AcF), evaluada por MTS (% del control, C:100,4 \pm 1.7, AcF(0.02 $\mu\text{g/ml}$):98.3 \pm 5.4, (0.1 $\mu\text{g/ml}$):75.9 \pm 13.8**, (1 $\mu\text{g/ml}$):87.6 \pm 9.1*, (5 $\mu\text{g/ml}$):86.4 \pm 11.8**, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Dunnett) y por azul tripan (% de células vivas, C:75.10, AcF (5 $\mu\text{g/ml}$):65.32**, $p < 0.01$, Chi(2)). En CG provenientes de ratas con OAE tanto con lesión focal (50 días) como severa (80 días) observamos un aumento de la actividad de la caspasa 8 (método colorimétrico) de 2.5 y 4.3 veces respectivamente, vs CG de ratas controles. La expresión de Bcl-2 y Bax fue estudiada por inmunohistoquímica y Western Blot. Bcl-2 fue localizada principalmente en células de Sertoli y espermatogonias y Bax en espermatozoides y espermátides y en las células que se descaman de los ts. La expresión de Bcl-2 aumentó en las ratas con OAE a los 50 y 80 días, mientras que la de Bax sólo aumentó a los 80 días. La disminución de la viabilidad celular inducida por el antagonista de FasR y el aumento de la actividad de la caspasa 8 confirman la participación de FasR en la apoptosis de las CG en la OAE. La disminución de la viabilidad celular inducida por el antagonista de FasR y el aumento de la actividad de la caspasa 8 confirman la participación de FasR en la apoptosis de las CG en la OAE. Por otro lado, el aumento de la expresión de Bcl-2 y Bax indica un rol regulatorio de estas proteínas en el proceso de muerte en este cuadro.

313. (3835) ROL DE LOS ESTEROIDES SEXUALES EN LA REGULACION OPIOIDE DE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA (PRL) INDUCIDA POR ESTRÉS EN LA RATA. SOAJE, MARTA; DINASSO, ELINA; DEIS, RICARDO

IMBECU-CONICET

Los opioides endógenos regulan la secreción de PRL en el proestro, preñez, lactancia y en respuesta al estrés. El ambiente esterooidal afecta la regulación opioide de la secreción de PRL. Se estudió el efecto de los esteroides sexuales en la regulación opioide de la secreción de PRL inducida por estrés. Se utilizaron ratas en estro, en día 3 y 19 de gestación y androgenizadas neonatalmente (AND). Los grupos se trataron con: mifepristone (M, 2 mg/kg, sc, día 18 de preñez, 21 h), Tamoxifeno (TAM 0.5 mg/kg, v.o, días 14-15 de preñez, 16 h) y naloxone (NAL 2 mg/kg, ip, 30 min antes de la decapitación). Los animales se sometieron a un estrés con eter (2 min), 5 min antes del sacrificio (9 – 10 h). La PRL sérica se midió por RIA. NAL previno la respuesta al estrés en ratas AND (C: 30.8 ± 3.9 ng/ml; C+estrés: 58.9 ± 3.4 ng/ml; NAL+estrés: 40.5 ± 4.5), en ratas AND con 2 dosis de progesterona (Pg, 5 mg/kg s.c. 8 y 20 h) y en ratas en estro (C: 96.1 ± 33.9 ng/ml; NAL: 2.6 ± 0.4 ng/ml). En el día 3, NAL no tuvo efecto. En el día 19 de preñez, NAL ó mifepristone aumentaron la PRL en respuesta al estrés (C+estrés: 10.9 ± 4.6 ng/ml; NAL: 25.7 ± 4.2 ng/ml; M: 25.6 ± 4.9 ng/ml). La asociación de ambos tratamientos no modificó dicha respuesta. TAM previno la secreción de PRL en respuesta al estrés inducida por NAL ó M (C+estrés: 5.3 ± 1.3 ng/ml; NAL: 5.9 ± 0.9 ng/ml; M: 7.6 ± 2.6 ng/ml). Los resultados obtenidos sugieren que NAL previene el aumento de PRL en respuesta al estrés ante una acción aguda (estro) ó crónica de estradiol (Eg) (AND). Al final de la preñez, los opioides y Pg bloquean el aumento de PRL inducido por estrés siendo este efecto Eg dependiente. Se concluye que los esteroides sexuales condicionan la respuesta de los opioides endógenos sobre la secreción de PRL inducida por estrés.

314. (3857) LA PROTEÍNA TESTICULAR TPX-1 ESTARÍA INVOLUCRADA EN EL PROCESO DE FUSIÓN DE GAMETAS EN RATÓN Y HUMANO. BUSSO, DOLORES;

COHEN, DEBORA J; DA ROS, VANINA G; CUASNICU, PATRICIA S

Instituto de Biología y Medicina Experimental

La proteína testicular TPX-1 (25 kDa) es sintetizada por las células germinales de los mamíferos con un alto grado de conservación. Resultados previos de nuestro laboratorio indicaron que TPX-1 se encontraría localizada en el acrosoma del espermatozoide, asociada a la matriz acrosomal, y que podría tener una función en la fertilización. El objetivo del presente trabajo fue determinar en qué etapa de la interacción espermatozoide-ovocito participa TPX-1. Experimentos de fertilización in vitro de ratón indicaron que anti-TPX-1 1/50 produjo una inhibición dosis dependiente y significativa del % de ovocitos fertilizados (16 ± 3 vs ctrl: 50 ± 6 ; $p < 0,05$). Mientras que la penetración de la zona pelúcida (ZP) no se vio afectada, el aumento en el n° de espermatozoides perivitelinos en presencia de anti-TPX-1 ($1,8 \pm 0,9$ vs ctrl: $0,4 \pm 0,2$; $p < 0,05$) sugirió un efecto del anticuerpo sobre la etapa de fusión de las gametas. Estos resultados fueron respaldados por la unión de TPX-1 recombinante al oolema pero no a la ZP del ovocito de ratón, observada en ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Asimismo, la participación de TPX-1 humana en fusión fue demostrada mediante ensayos de penetración de ovocitos de hamster sin ZP por espermatozoides humanos, en los que anti-TPX-1 1/50 produjo una inhibición significativa del % de ovocitos penetrados (57 ± 8 vs ctrl: 86 ± 5 ; $p < 0,05$). Finalmente, ensayos de Western blotting descartaron la posible reacción cruzada de anti-TPX-1 con DE, una proteína homóloga cuya participación en fusión ha sido ampliamente demostrada. En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que la proteína testicular TPX-1, al igual que su homólogo epididimario DE, estaría involucrada en la fusión de gametas tanto en el ratón como en el humano.

315. (3870) EFECTO DEL DI-(2-ETILHEXIL) FTALATO (DEHP) SOBRE LA EXPRESIÓN DE N-CADHERINA Y MOLÉCULAS ASOCIADAS EN EL TESTÍCULO DE RATAS PREPÚBERES. SOBARZO, CRISTIAN*; LUSTIG, LIVIA; DENDUCHIS, BERTA

*Centro de Investigaciones en Reproducción Fac. de Medicina UBA, BsAs, Argentina. *Fac. de Ciencias, Universidad Católica de Tecnolía Chile*

El DEHP es un ester de ftalatos, el cual posee un efecto tóxico principalmente sobre las células germinales y de Sertoli. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del DEHP, sobre la expresión de N-cadherina y moléculas asociadas (b-catenina, y p120), en la unión célula-célula en el epitelio germinal de ratas prepúberes. Ratas de 25 días de edad fueron tratadas (T) con una dosis de DEHP 2 g/Kg/día, por 2 días, vía "gavage" (n=6). Como control (C) se utilizaron ratas (n=6) de la misma edad que recibieron el vehículo (aceite). Ambos grupos fueron sacrificados al 3er. día del tratamiento. Los testículos fueron procesados para histología, inmunofluorescencia (IF) y "Western Blot" (WB). El peso testicular disminuyó en el grupo T (152 ± 30 mg), respecto de C (216 ± 31 mg) ($p < 0.001$). En el grupo T se observó un daño generalizado en los túbulos seminíferos, caracterizado por una extensa descamación de las células germinales más maduras que permanecen en la luz del túbulo. Por TUNEL, se observó un aumento en el N° de células germinales Tunel +/ túbulo en el grupo T (3.44 ± 0.27), v/s C (0.43 ± 0.06) ($p < 0.001$). Por IF se detectó N-cadherina, b-catenina y p120, en las células basales de los túbulos seminíferos, en el grupo T y C. Por WB, extractos de testículos incubados con anticuerpos anti-N-cadherina, p120 y b-catenina, revelaron bandas de alrededor de 130, 120 y 90 kDa, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la expresión de estas moléculas, entre el grupo C y T. Los resultados sugieren que la N-cadherina que se expresa principalmente en el área basal del túbulo seminífero, no estaría involucrada en el proceso de descamación de los

espermatozoides, inducida por el DEHP. (Subsidiado por OPS-RELAB y MECESUP, Temuco, Chile)

316. (3898) DESARROLLO DE LA GLANDULA MAMARIA EN RATONES DEFICIENTES PARA CATEPSINA-L. CASTILLO, LILIAN F.; LOMBARDI, GABRIELA; RAMOS, MARIAN.; OLEA, DANIELA; PIAZZON, ISABEL; KORDON, EDITH; MEISS, ROBERTO; NEPOMNASCHY, IRENE

ILEX-CONICET-IIHEMA-Academia Nacional de Medicina Division Medicina experimental, IIHEMA y Centro de Estudios Oncológicos, Academia Nac. de Medicina.

Las interacciones entre el epitelio, las células estromales y la matriz extracelular son cruciales para el desarrollo, diferenciación e involución de la glándula mamaria. Distintas proteasas, especialmente metaloproteasas intervienen en estos procesos. En el presente estudio ratones hembras portadores de una delección en el gen para catepsina-L fueron utilizados para investigar si esta serin-proteasa juega un rol en el desarrollo mamario. Se estudiaron mamas de hembras mutantes y normales de 37, 41, 56, 125, 165 y 241 días de vida. Estudios de montaje completo permitieron observar que las hembras mutantes presentaban desarrollo completo, aunque ligeramente retardado, de las glándulas mamarias. Se realizaron estudios morfológicos e inmunohistoquímicos en los cortes consecutivos correspondientes. Los principales hallazgos en mamas de ratones mutantes respecto de los controles normales fueron: a) desarrollo de conductos dilatados con paredes flexuosas con invaginaciones intraluminales del estroma periductal; b) pared ductal de menor espesor, hipocelular con estroma conectivo levemente eosinófilo; c) escasa marcación para laminina en pared ductal y basal del epitelio de revestimiento; d) presencia de más hileras de células de revestimiento ductal aún en conductos de mayor calibre; e) ausencia o distribución irregular de laminina alrededor de las células que conforman los brotes sólidos y de los brotes como unidad; f) retardo en el proceso de canalización de los brotes sólidos terminales. Estas observaciones sugieren que la catepsina-L participa en la morfogénesis de la glándula mamaria, dado que la ausencia de su actividad enzimática induce alteraciones morfológicas y cambios en el patrón de distribución de la matriz extracelular.

317. (4028) PÉRDIDAS FETALES EN RATONES MUTANTES DEFICIENTES EN IL-6: UN CASO DE RESPUESTA INMUNE HUMORAL INAPROPIADA. DUBINSKY, V¹; SRPEK, L²; JUNOVICH, G¹; ROBERTSON, S²; MARGNI, R¹; GUTIERREZ, G²

1IDEHU-FFYB, Universidad de Buenos Aires 2Depto. Ginec. y Obstet. Universidad de Adelaida, Australia

La cepa mutante de ratones C57BL/6 deficiente para IL-6 presenta, con respecto a la cepa original, un descenso del 23% en el índice de implantación y tres veces mayor índice de pérdidas fetales. Por otra parte, hemos demostrado que determinados niveles de IL-6 son necesarios para prevenir el alto índice de aborto que presenta el modelo abortador murino CBA/J x DBA/2. Mas aún, IL-6 estaría implicada en la glicosilación de moléculas IgG, modulando la calidad de la respuesta inmune durante la gestación hacia una respuesta Th2 mediada por anticuerpos bloqueantes (asimétricos). Por estos antecedentes, hemos decidido estudiar la producción de estos anticuerpos en sueros de ratones IL-6 knockout. Se emplearon 30 hembras C57BL/6 IL6-/- x C57BL/6 IL6-/- y 30 hembras C57BL/6 x C57BL/6 (IL-6+/+). Se extrajeron los sueros correspondientes a los días 16 a 20 de la preñez y se determinó el índice de pérdidas fetales. El porcentaje de moléculas IgG asimétricas se determinó por cromatografía de afinidad a la Con-A y ELISA sandwich, utilizando anticuerpos comerciales. Los resultados mostraron que la producción de IgG asimétrica en el suero de ratones knockout para IL-6 se encuentra significativamente disminuida con respecto a los sueros de hembras C57BL/6 (19 vs 31%, respectivamente, $p < 0,05$) mientras que el índice de pérdidas fetales se incrementó de 19% a

28% para la cepa mutante. Estos datos constituyen otra evidencia más de que la IL-6 es uno de los factores involucrados en la síntesis de anticuerpos bloqueantes (asimétricos) y sugieren que la modulación de la respuesta inmune humoral durante la gestación constituye uno más de los mecanismos que conforman la compleja red de factores protectores de la unidad feto-placentaria.

FARMACOLOGÍA I

318. (3461) EL ÓXIDO NÍTRICO INHIBE LA SECRECIÓN DE AMILASA EN PARÓTIDA DE RATONES NORMALES: CONSECUENCIAS EN RATONES NOD CON DEFICIENTE ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA. ROCA, VALERIA; ROSIGNOLI, FLORENCIA; CALAFAT, MARIO; DI NAPOLI, JENNIFER; PEREZ LEIROS, CLAUDIA

Departamento de Química Biológica, FCEN (UBA), CONICET

Los ratones NOD representan un modelo adecuado para estudiar la disfunción secretoria salival de los pacientes con síndrome de Sjögren. Dado que estos ratones presentan alteraciones en la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) en glándulas salivales así como una respuesta deficiente al péptido intestinal vasoactivo (VIP), decidimos estudiar la participación del NO en la secreción de amilasa estimulada por VIP en las glándulas salivales de ratones normales y NOD. Determinamos la secreción de amilasa in vivo e in vitro por un método espectrofotométrico, y los niveles de AMPc y GMPc por RIA. Se observó un aumento significativo de la secreción de amilasa in vivo en ratones NOD respecto de los BALB/c e in vitro en las parótidas de NOD (% liberación amilasa in vitro BALB/c 37 ± 16 , NOD 78 ± 16 , $p < 0.05$, $n=6$). La inhibición de la NOS con L-NMMA aumentó la secreción estimulada por VIP 10^{-7} M in vitro y dicha reversión de la regulación negativa fue mayor en los ratones BALB/c. Además, la inhibición de la NOS no afectó la acumulación de AMPc estimulada por VIP (10^{-7} M) en ningún caso (AMPc (fmol/mg) BALB/c 442 ± 22 , NOD 296 ± 32 , con L-NMMA: BALB/c 373 ± 121 , NOD 264 ± 39) mientras que redujo los niveles de GMPc sólo en ratones BALB/c. El uso de trifluoperazina (inhibidor de la Ca²⁺-calmodulina, cofactor de la NOS) produjo un aumento significativo de la secreción de amilasa basal y estimulada por VIP por las parótidas de ratones BALB/c pero no de los NOD. El óxido nítrico regula en forma negativa la secreción de amilasa basal y estimulada por VIP en glándulas parótidas de ratón. En un modelo murino con alteración de la NOS (ratones NOD) dicha regulación no se observa.

319. (3512) ESTUDIO DE ALGUNOS MECANISMOS DETERMINANTES DE LA ELIMINACIÓN RENAL DE SULFANILAMIDA EN EL TIEMPO EN UN MODELO DE CALCIFICACIÓN DISTRÓFICA EN RATAS. QUAGLIA, NORA; BRANDONI, ANABEL; TORRES, ADRIANA M.

Area Farmacología.Fac. Cs Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R..CONICET.

Estudios previos dieron cuenta de modificaciones en la depuración sistémica de Sulfanilamida (SA), droga de excreción preferencial por vía renal, en ratas con calcificación distrófica producida por sobredosis de vitamina D3. En el presente trabajo, se pretende estudiar el clearance renal de Sulfanilamida (ClrSA) y algunos parámetros determinantes del mismo a lo largo del tiempo en ratas tratadas con vitamina D3. Se trabajó con ratas Wistar macho adultas, se procesó un grupo control (C) ($n=6$), uno tratado con una sobredosis de vitamina D3 (300000UI/Kg.p.c.) 10 días (T1) ($n=6$) y otro 20 días (T2) ($n=8$) previo al experimento. Se valoró el contenido de calcio total en plasma (Cap) por espectrofotometría, en tejido aórtico (Caa) por espectrofotometría de absorción atómica y la presión arterial sistólica (PAS) usando un esfigmomanómetro. Se determinó el ClrSA, y la velocidad de filtración glomerular (VFG) empleando técnicas convencionales

de clearance y el flujo sanguíneo renal (FSR) mediante el uso de microesferas fluorescentes. Los resultados se analizaron con test de ANOVA y posttest de Newman Keuls ($p < 0.05$ a vs C, b vs T1). Resultados: Los grupos T1 y T2 presentaron valores de Caa y PAS sostenidamente elevados respecto de C; Cap se mantuvo en valores normales en todos los grupos estudiados. ClrSA (ul/min/100g.p.c.): C= 230 ± 20 ; T1= $160 \pm 3a$; T2= $190 \pm 10a$; FSR (ml/min/100g.p.c.): C= 5.32 ± 0.75 ; T1= $1.58 \pm 0.39a$; T2= $4.73 \pm 0.97b$; VFG (ml/min/100g.p.c.): C= 0.73 ± 0.07 ; T1= $0.43 \pm 0.01a$; T2= $0.75 \pm 0.10b$. Las variaciones del FSR condicionarían a las de la VFG, observándose una marcada disminución a los 10 días postratamiento y recuperación de ambas variables a los 20 días. Estos resultados justificarían, en parte, las modificaciones encontradas en la eliminación renal de SA en el tiempo.

320. (3616) QUERCETINA EXTRAIDA DE LIGARIA CUNEIFOLIA (QLC): ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES HEMORREOLÓGICAS Y EXCRECIÓN BILIAR EN RATAS. FERRERO, MARIANA; CROSETTI, DIEGO; DOMINIGHINI, ALICIA; ALVAREZ, LUJÁN; RONCO, MARÍA TERESA; WAGNER, MARCELO; GURNI, ALBERTO; CARNOVALE, CRISTINA ESTER; LUQUITA, ALEJANDRA

Fac. Cs. Médicas. UNR. Fac. Cs. Bioq. y Farm. -UNR. Farmacia y Bioquímica-UBA. CONICET-CIURN.

Hemos demostramos que ratas tratadas con extracto crudo de Lc por vía intraperitoneal (ip), incrementa la viscosidad sanguínea, disminuye el colesterol (Co) plasmático y aumenta la excreción biliar de Sales Biliares y Co. Objetivo: analizar el efecto de la quercetina extraída de Lc (QLc) sobre las propiedades hemorreológicas y sobre la excreción biliar (EB). Métodos: Ratas Wistar machos adultas Controles (C) ($n=6$) inyectadas ip con Solución Fisiológica y tratadas con QLc ($n=6$), inyectadas ip cada 24 horas durante 3 días con una dosis de $2,3\text{mg/100 g PC}$ (T). Resultados: (x media \pm ES). Viscosidad sanguínea relativa corregida a un hematocrito del 45% : C: $4,66 \pm 0,29$; QLc: $6,64 \pm 0,69^*$. Índice de rigidez: C: $9,64 \pm 0,80$; QLc: $17,78 \pm 2,46^*$. Forma eritrocitaria: C: $-1,17 \pm 0,24$ QLc: $-2,21 \pm 0,09^*$; Descenso de Co plasmático (Colesterol basal - Colesterol post- tratamiento QLc): $-0,21 \pm 0,09$; EB Sales Biliares: C: $46,6 \pm 2,2$; QLc: $52,4 \pm 4,8$; EBCo: C: $1,39 \pm 0,22$; QLc: $1,58 \pm 0,31$; Flujo biliar: C: $1,65 \pm 0,17$; QLc: $1,68 \pm 0,15$. (* $p < 0,05$ vs. C) Conclusión: El tratamiento con QLc produce un cambio en la forma del glóbulo rojo de discocito a estomacocito y al mismo tiempo una rigidización eritrocitaria provocando un aumento de la viscosidad sanguínea. Estos cambios pueden atribuirse a la interacción de QLc con la membrana eritrocitaria. El análisis de los componentes de excreción biliar no mostraron cambios significativos con el tratamiento de QLc; tampoco se observó descenso del Co plasmático, a diferencia de lo demostrado para la administración de distintas dosis del extracto crudo de Lc. Esto sugiere que otro componente del extracto de Lc sería el responsable del descenso del colesterol plasmático.

321. (3816) MÉTODO ALTERNATIVO A LA DL50 (IN VIVO) EN CULTIVOS CELULARES (IN VITRO) PARA ESTABLECER LETALIDAD DE VENENOS ANIMALES. DOKMETJIAN, JOSE CHRISTIAN; LITWIN, SILVANA; LEWIS, ADRIÁN; BOLLA, GUSTAVO; TOUS, MÓNICA; VARNI, LILIANA

ANLIS-Malbrán-INPB ANLIS-Malbrán-INEI

Teniendo en cuenta que la determinación de la DL50 de venenos nos enfrenta a una actitud bioética, además de ensayos con tiempos prolongados y antieconómicos, nos propusimos probar técnicas que superaran estos obstáculos. Para ello intentamos estudiar la letalidad de los venenos de Bothrops alternatus (Ba) y Crotalus durissus terrificus (Cdt) sobre una serie de cultivos in vitro de los cuales las células VERO demostraron una mayor reproducibilidad. Se expusieron cultivos de células VERO de 22hs de crecimiento a diluciones seriadas de los

venenos de Ba y Cdt, durante 5hs de incubación. La citotoxicidad de los venenos fue evaluada utilizando un ensayo de viabilidad colorimétrico mediante la tinción con cristal violeta, midiéndose finalmente la absorbancia de los cultivos a 595 nm. Se relacionaron los resultados para la DL50 ev (n=10) de Ba ($1,35 \pm 0,39$) $\mu\text{g/g}$ ratón frente a ensayos IC50 (Índice de citotoxicidad 50, determinado para la cantidad de veneno que produce la muerte del 50% del cultivo celular) en células VERO (n=10) de Ba ($56,6 \pm 7,4$) $\mu\text{g/ml}$ y DL50 ev (n=10) de Cdt ($0,18 \pm 0,05$) $\mu\text{g/g}$ ratón frente a ensayos IC50 (n=10) de Cdt ($46,3 \pm 5,1$) $\mu\text{g/ml}$ obteniéndose una correlación positiva ($p < 0,01$; $R^2 = 0,754$). De los resultados obtenidos podríamos inferir que el método propuesto podría ser una alternativa al método tradicionalmente utilizado. A partir de este trabajo estaríamos en condiciones de valorar los respectivos antivenenos (DE50) en cultivos de células VERO suplantando así también a los animales en este tipo de ensayos.

322. (3938) POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL AL AGONISTA LISIL-DES-ARG9-BK (LDABK) MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE METALOPEPTIDASAS EN VENA UMBILICAL HUMANA (VUH). NOWAK, WANDA; GOLDSCHMIDT, EZEQUIEL DARIO; PUGLIESE, MARIANA INES; FALCIONI, ALEJANDRA GEORGINA; ROTHLIN, RODOLFO PEDRO

Tercera Catedra de Farmacología. Facultad de Medicina. UBA

Introducción y Objetivos: Las cininas son hidrolizadas por metalopeptidasas que se encuentran unidas a la membrana plasmática de numerosas células. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si las enzimas convertidora de angiotensina (ECA), endopeptidasa neutral (NEP) y aminopeptidasa M (APM) participan en la inactivación biológica del agonista LDABK en VUH. **Métodos:** Utilizando la técnica de órgano aislado los anillos de VUH fueron incubados bajo tensión isométrica en solución de Krebs a 37°C a pH 7.4 y burbujeados con carbógeno. Luego de 5h de incubación se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) al agonista selectivo para el receptor a cininas B[1] LDABK en ausencia y presencia de inhibidores enzimáticos. **Resultados:** Captopril $1\mu\text{M}$ (C, inhibidor de la ECA) o Amastatina $10\mu\text{M}$ (A, inhibidor de la APM) indujeron un corrimiento hacia la izquierda de la CCR a LDABK (pCE[50] control: 9.15 ± 0.03 ; C: 9.39 ± 0.07 ; A: 9.47 ± 0.07 , $p < 0.05$). Sin embargo, no se observó potenciación de la respuesta luego de la aplicación de Fosforamidón $10\mu\text{M}$ (F, inhibidor de la NEP). La exposición conjunta a C+A o a F+A indujo una potenciación de la respuesta a LDABK que fue mayor en comparación con la aplicación individual de los inhibidores mencionados (pCE[50] C+A: 9.80 ± 0.05 , F+A: 9.88 ± 0.05 , $p < 0.05$). La exposición conjunta a los tres inhibidores indujo una potenciación de la respuesta contráctil a LDABK que fue mayor en comparación con la aplicación concomitante de dos inhibidores (pCE[50] C+A+F: 10.15 ± 0.06 , $p < 0.05$). **Conclusiones:** Estos resultados indican que en VUH las metalopeptidasas participan en la inactivación biológica del agonista endógeno LDABK, posiblemente reduciendo su concentración en biofase.

323. (3939) POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL INDUCIDA POR BRADICININA (BK) MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE METALOPEPTIDASAS EN VENA UMBILICAL HUMANA (VUH). NOWAK, WANDA; GOLDSCHMIDT, EZEQUIEL DARIO; PUGLIESE, MARIANA INES; FALCIONI, ALEJANDRA GEORGINA; ROTHLIN, RODOLFO PEDRO

Tercera Catedra de Farmacología Facultad de Medicina UBA

Introducción y Objetivos: Las cininas son péptidos biológicamente activos que son hidrolizados por metalopeptidasas que se encuentran unidas a la membrana plasmática de diferentes células. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si las enzimas convertidora de angiotensina (ECA) y endopeptidasa neutral

(NEP) participan en la inactivación biológica del agonista BK en VUH. **Métodos:** Utilizando la técnica de órgano aislado los anillos de VUH fueron incubados bajo tensión isométrica en solución de Krebs a 37°C a pH 7.4 y burbujeados con carbógeno. Luego de 2h de incubación se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) al agonista selectivo para el receptor a cininas B[2] BK en ausencia y presencia, 30 min antes de la CCR, de diferentes inhibidores enzimáticos. **Resultados:** Captopril $1\mu\text{M}$ (C, inhibidor selectivo de la ECA) o Fosforamidón $10\mu\text{M}$ (F, inhibidor selectivo de la NEP) indujeron un corrimiento hacia la izquierda de la CCR a BK (pCE[50] control: 10.01 ± 0.05 ; C: 10.54 ± 0.09 ; F: 10.55 ± 0.06 , $p < 0.001$). La exposición concomitante a C ($1\mu\text{M}$) y F ($10\mu\text{M}$) indujo una potenciación de la respuesta a BK que fue mayor en comparación con la aplicación individual de los inhibidores mencionados (pCE[50] C: 10.54 ± 0.09 ; F: 10.55 ± 0.06 , C+F: 10.91 ± 0.07 , $p < 0.05$). **Conclusiones:** Estos resultados indican que en VUH las metalopeptidasas participan en la inactivación biológica del agonista endógeno BK, posiblemente reduciendo su concentración en biofase.

324. (3988) EFECTO TROMBOLÍTICO DE LAS SUBPOBLACIONES DE DERMATÁN SULFATO. TUBIO, MARÍA ROSARIO; ALBERTO, MARÍA FABIANA; FERNANDEZ, MARTA ELENA; RECONDO, EDUARDO FRANCISCO; CALABRESE, GRACIELA CRISTINA

Cátedra de Biología Celular. departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Farmacia y Bioquímica Dpto Qca Biológica, Fac de Cs Exactas y Nat, UBA. Dto Hemost y Trombosis, Ac Nac de Medicina.

El dermatán sulfato (DS) potencia la inhibición de la trombina (T) inducida por el cofactor II de la heparina (HCII). Nuestro grupo de trabajo ha descrito las condiciones experimentales que permiten la interacción específica entre el DS y el primer complejo proteico de la cascada del complemento humano (C1); la presencia de iones calcio y la baja fuerza iónica del medio permiten aislar una muy pequeña fracción de DS (5%) cuya actividad anticoagulante, in vitro, es casi cuatro veces superior con respecto al DS de partida. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto trombolítico de las subpoblaciones de DS aisladas por interacción con C1 en un modelo de trombosis venosa inducida en ratas. Las condiciones experimentales de administración de DS fueron establecidas mediante el tiempo de T (TT). Luego de diez minutos de la administración endovenosa de 0.3 mg/kg/hs de DS (material de partida) se registró un incremento significativo del TT que regresó a los valores basales dentro de los 120 minutos (31 ± 1.15 seg, 129 ± 7.0 seg, 35 ± 14.5 seg, respectivamente, $n=3$; $P < 0.01$). El peso del trombo (PT), el TT, la lisis de euglobulina (LE), y el tiempo de hemorragia fueron medidos en los animales con trombos inducidos. El PT se redujo significativamente por la administración de DS (material de partida), con respecto al obtenido con el vehículo (2.40 ± 0.48 mg vs 7.23 ± 1.47 mg, $n=3$), sin embargo, esta disminución fue menos efectiva cuando se utilizó DS obtenido en el sobrenadante de la interacción (4.35 ± 0.17 mg). Aunque, entre estos animales no se detectaron diferencias significativas del TT (45.50 ± 5.5 , $n=6$), se observó una prolongación en la LE cuando se administró DS (material de partida) o sobrenadante de la interacción. La pequeña fracción de DS aislada a través de la interacción específica con el complejo proteico C1, sería la subpoblación responsable del efecto trombolítico como consecuencia de la elevada actividad anticoagulante detectada in vitro.

325. (4005) POTENCIACIÓN DEL EFECTO VASOCONSTRICCIÓN DE LYS-DES-ARG(9)-BRADICININA POR INHIBICIÓN DE LAS ENZIMAS CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA, ENDOPEPTIDASA NEUTRA Y AMINOPEPTIDASA M EN ARTERIA UMBILICAL HUMANA. PELOROSSO, FACUNDO GERMÁN; BRODSKY, PAULA TAMARA; ZOLD, CAMILA LIDIA; HALPERIN, ANA; JAITOVICH, MARIA DEL MAR; ROTHLIN, RODOLFO PEDRO

Tercera Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Se evaluó la relevancia funcional de las enzimas convertidora de angiotensina (ECA), endopeptidasa neutra (EPN) y aminopeptidasa M (APM) en la modulación de la respuesta contráctil inducida por el agonista selectivo del receptor B[1] a cininas, Lys-des-Arg(9)-bradicinina (Lys-des-Arg(9)-BK) en arteria umbilical humana (AUH). Se montaron anillos de AUH en baños de órgano aislado en solución de Krebs a 37°C, pH 7.4, burbujeados con carbógeno. Los inhibidores enzimáticos y el antagonista selectivo de los receptores B[1], Lys-des-Arg(9)-Leu(8)-BK, se agregaron 30 min antes de la realización de las curvas concentración-respuesta (CCR) a Lys-des-Arg(9)-BK y al agonista de los receptores B[1] resistente a la inactivación enzimática, Sar-D-Phe(8)-des-Arg(9)-BK, luego de 5 hs de incubación. Los resultados están expresados como media \pm SEM y las respuestas máximas como porcentaje de la contracción a serotonina 10(-5)M, administrada al final de cada experimento. Captopril 1 μ M (C), fosforamidón 10 μ M (F), amastatina 10 μ M (A) o C + A, aumentaron las respuestas máximas a Lys-des-Arg9-BK (control: 48.0 \pm 10.0%, n=15; C: 66.1 \pm 12.3%, n=9; F: 87.4 \pm 1.1%, n=6; A: 60.1 \pm 14.5%, n=6; C + A: 81.4 \pm 4.5%, n=15; P<0.05). El tratamiento con C + F + A potenció la curva con respecto a C + A (C + F + A: pCE[50] 8.86 \pm 0.09, n=6; C + A: pCE[50] 8.32 \pm 0.05, n=15; P<0.01). En presencia de C + F + A, Lys-des-Arg(9)-Leu(8)-BK antagonizó competitivamente las respuestas a Lys-des-Arg(9)-BK (pK[B] 8.57). El tratamiento con C + F + A no modificó la CCR a Sar-D-Phe(8)-des-Arg(9)-BK. Los resultados indican que en AUH el agonista Lys-des-Arg(9)-BK actúa a través de receptores B[1] a cininas y que, además, las enzimas ECA, EPN y APM provocan una relevante inactivación biológica del mismo, posiblemente reduciendo su concentración en biofase.

326. (4049) BIOMPHALARIA GLABRATA UN ORGANISMO POSIBLE DE SER UTILIZADO COMO CENTINELA EN CONTAMINACIÓN DE ECOSISTEMAS DULCEACUÍCOLAS. MATKOVIC, L; NAHABEDIAN, D E; ANSALDO, M; HOLMES-BROWN, E; EMILIOZZI, S; ANSAY, C; LONGINOTTI, G; RUMILLE, S; WIDER, E A

Laboratorio de Biomarcadores. Depto de Química Biológica. FCEN.UBA.CONICET

Los ecosistemas dulceacuícolas son considerados como recursos fundamentales para la vida en nuestro planeta. El empleo de invertebrados para monitorear la calidad de los mismos es una herramienta de amplia difusión. En nuestro laboratorio utilizamos a *Biomphalaria glabrata* como biomonitor para evaluar impacto de contaminantes de relevancia ambiental como el cadmio. Nuestro objetivo es ensayar biomarcadores que puedan ofrecer una información precisa de la contaminación presente. Sabiendo que el cadmio tiene una acción prooxidante, ensayamos diferentes actividades de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT)) y marcadores de estrés oxidativo (peroxidación de lípidos (LPO) y oxidación de proteínas (OP)). Lotes de 6 animales fueron expuestos a 0.05 ppm de cadmio a diferentes tiempos. En todos los casos los controles fueron expuestos a los mismos tiempos .ensayados. En glándula digestiva, la exposición aguda (dos días) aumentó las actividades de CAT y SOD (50% y 30% respectivamente). LPO y OP no mostraron diferencias significativas. Exposiciones crónicas (14 días) disminuyeron un 50% las actividades de ambas enzimas con aumento de LPO y OP al final de la exposición. De los resultados obtenidos se puede inferir que *Biomphalaria glabrata* puede ser utilizado como un adecuado organismo centinela por la respuesta de los parámetros ensayados.

GASTROENTEROLOGÍA II

328. (3588) INFECCION POR HELICOBACTER PYLORI: ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS EN NIÑOS. Martínez Sarraquae

M.¹, Barrado A.¹, Goldman C.^{1,2}, Balcarce N.³, Cueto Rúa E.³, Oshiro M.⁴, Calcagno M.⁵, Salgueiro J.^{1,2}, Calmanovici G.^{1,2}, Boccio J.^{1,2}, Zubillaga M.^{1,2}.

¹Laboratorio de Isótopos Estables aplicados a Biología y Medicina, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina; ²Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina; ³Hospital de Niños "Sor María Ludovica", La Plata, Buenos Aires Argentina; ⁴Centro Asistencial "Di Matteo", San Fernando, Buenos Aires, Argentina; ⁵Cátedra de Matemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Introducción: El *Helicobacter pylori* es el principal factor etiológico de la gastritis crónica y la úlcera duodenal. Factores socioeconómicos influyen en la prevalencia de la infección, que en países subdesarrollados es adquirida principalmente en la niñez. Nosotros estudiamos la prevalencia de la infección por *H. pylori* en niños sintomáticos y la correlacionamos con diversos factores potenciales para su adquisición y transmisión. Materiales y Métodos: 137 niños de 4 a 15 años que acudieron a la consulta gastroenterológica con pirosis y dolor abdominal recurrente fueron evaluados mediante el 13C-Urea Breath Test (13C-UBT) y video-endoscopia. Los padres de los niños completaron una encuesta epidemiológica. Para la evaluación estadística se utilizaron los test t-Student, exacto de Fisher y Gauss, con p<0.05. Resultados: La edad promedio de los niños evaluados fue de 9.93 \pm 2.14 años; la mayoría con un nivel socioeconómico medio, y buenas condiciones sanitarias. No se observaron diferencias en los hábitos alimenticios de los pacientes Hp+ y Hp-. De 137 niños, 44 resultaron positivos para el 13C-UBT. Las endoscopias demostraron en la mayoría de los casos gastritis crónica por *H. pylori*. La prevalencia de la infección en la población evaluada fue de 32.12%. Un 65.79% de los niños que resultaron Hp+ tomaba mate o compartía el recipiente de otras bebidas. Fueron reportados antecedentes familiares de patologías digestivas en el 78.95% de los niños. Conclusiones: Aún con un status socioeconómico medio para los pacientes evaluados, nuestros hallazgos de prevalencia fueron más elevados a los previamente reportados en nuestro país. Los factores de riesgo potencial en la transmisión de la infección encontrados en nuestro estudio coinciden con los descriptos por otros autores.

329. (3601) EFECTO DIFERENCIAL DE SILIMARINA (SM) Y SILIBININA (SB) SOBRE LA GLUCURONIZACIÓN DE P-NITROFENOL EN LA RATA. D'ANDREA, VANESA; SÁNCHEZ POZZI, ENRIQUE

Instituto de Fisiología Experimental - Fac. Cs. Bioq. y Farm - UNR - CONICET

SM es un hepatoprotector utilizado clínicamente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias hepáticas. Es un extracto constituido por una mezcla de flavonolignanos entre los que se destaca la SB, considerada como el principio activo de la mezcla. Trabajos previos demostraron que SB inhibe in vitro las actividades enzimáticas glutatión S-transferasa y citocromo P450. El presente trabajo tiene como objetivo determinar si SM o SB tienen efecto directo sobre el sistema enzimático UDP-glucuronosiltransferasa, usando como sustrato modelo al p-nitrofenol (pNF). Métodos: La glucuronización de pNF se midió en microsomas de hígado de rata usando concentraciones fijas de pNF (0.125 mM) y ácido UDP-glucurónico (2.5 mM), en presencia de SM o SB (20 μ g/ml). Eventualmente, para dilucidar el tipo de inhibición se utilizaron concentraciones variables de pNF (0.018 a 0.180 mM) y el potencial inhibidor (0 a 40 μ g/ml). Los resultados de este último estudio se analizaron mediante un programa de computación. Resultados (media \pm DE, n = 4): SM inhibió significativamente la glucuronización de pNF (SM 7.1 \pm 0.2 nmol/min/mg prot vs. Control: 8.1 \pm 0.3, p<0.05) mientras que SB no afectó la actividad enzimática (7.9 \pm 0.2). La inhibición por SM fue del tipo competitiva con una Ki: 56 \pm 11 μ g/ml. SM demostró actuar en forma directa sobre la enzima que glucuroniza pNF dife-

renciándose de SB, su principal constituyente, e indicando que otros compuestos presentes en el extracto serían responsables de la inhibición. El efecto de SM podría tener consecuencias sobre la vida media de drogas coadministradas que sufren glucuronización, hecho que tendría que considerarse cuando se indique la administración de este extracto para el tratamiento de enfermedades hepáticas.

330. (3619) EFECTO DIFERENCIAL DE LA SILIMARINA (SIL) Y SU COMPONENTE ACTIVO SILIBININA (SB) SOBRE EL DAÑO DE MEMBRANA PLASMÁTICA HEPATOCELULAR INDUCIDO POR AGENTES TENSIOSACTIVOS. BASIGLIO, CECILIA LORENA; OCHOA, JUSTINA ELENA; SÁNCHEZ POZZI, ENRIQUE JUAN; ROMA, MARCELO GABRIEL

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) - CONICET-UNR

La SIL es un extracto natural con propiedades hepatoprotectoras constituido por varios flavonolignanos, siendo SB el principal constituyente (>60%). SB es considerado el principal responsable de sus propiedades hepatoprotectoras, aunque en muchos casos esto no ha sido corroborado. Aquí analizamos comparativamente la capacidad de SIL y SB para proteger la membrana plasmática del daño inducido por detergentes en el modelo de hepatocitos aislados de rata. SIL (c.s.p. obtener una concentración final de 500 µM en SB) protegió significativamente el daño de membrana inducido por el detergente formador de miscelas Tritón X-100 (TX100, 0,025 % v/v), medido a través de la liberación al medio de LDH (% del contenido celular total: 95±5 vs 63±4, p<0,01). En cambio, SB (500 µM) no sólo no ejerció protección a esta dosis de TX100, sino que exacerbó el daño de membrana inducido por TX100, incluso a concentraciones menores del detergente (0,015 % v/v: 48±5 vs 97±4, p<0,001). Sin embargo, cuando digitonina (5 µM), un agente complejante del colesterol, fue utilizada para ejercer daño de membrana, tanto SIL como SB exacerbaron este efecto (39±4 vs 93±3 y 80±10, para SIL y SB, respectivamente, p<0,01). Los resultados obtenidos con LDH coincidieron con los obtenidos usando como marcador ALAT, otra enzima citosólica, y se correlacionaron con la remoción al medio de la enzima de membrana gGT. Estos resultados muestran que SIL y SB tienen un efecto diferencial sobre la estabilidad de membrana frente al daño inducido por agentes tensioactivos formadores de miscelas mixtas, mientras que ambos sensibilizan la membrana ante el efecto solubilizador selectivo de digitonina sobre el colesterol. Se concluye que otros componentes de SIL diferentes de SB protegen la membrana de la solubilización miscelar no selectiva de lípidos.

331. (3630) EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL TURNOVER INTESTINAL DE GLUTATION EN RATAS. (1)ORIHUELA, DANIEL; (2)PREGI, NICOLÁS; (1)MEICHTRY, VERÓNICA

(1)Fisiología Humana, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (2)Departamento Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Previamente encontramos que el aluminio (Al) reducía el nivel intestinal de glutation (GSH) contribuyendo al deterioro de funciones absorbivas. El objetivo del trabajo fue analizar el efecto del Al sobre la dinámica intestinal de secreción, captación y manejo tisular de GSH. Tanto GSH como cisteína desempeñan un rol fundamental en el mantenimiento del status redox luminal e intracelular en el intestino delgado indispensable para sostener la función absorbiva. Ratas Wistar fueron tratadas con 1 mmol AlCl₃/kg/día o.g. por 7 días, o vehículo (V). Se midieron actividades de enzimas claves relacionadas con el metabolismo de GSH. Al disminuyó la actividad específica intestinal de GSH-sintetasa un 60±3% y de GSSG-reductasa un 40±2%, y aumentó la de glutamiltranspeptidasa (gGT) un 73±2%, respecto de V (P<0,05). El Al modificó el potencial redox (Eh) celular calculado para el sistema GSSG/2GSH (V: Eh=201±6 mV; Al: Eh=132±5 mV, P<0,05).

Para evaluar secreción y captación luminal de GSH, segmentos yeyunales evertidos, de grupos Al y V, fueron incubados in vitro bajo distintas condiciones: presencia o no de GSH, combinado con D,L-butionin-sulfoximina (inhibidor síntesis GSH) y/o AT-125 (inhibidor gGT). Se determinó time-course de GSH y de tioles totales (ThT). El tratamiento con Al disminuyó la secreción de GSH (0,83±0,24 vs 1,56±0,32 umol/h/g tej.húm., n=8, P<0,05) en ensayos con AT-125 sin adición de GSH y produjo aumento del flujo de ThT (2,50±0,10 vs 1,80±0,20 umol/h/g tej.húm., n=6, P<0,05) en ensayos sin GSH. Los resultados indican que el Al podría disminuir el turnover intestinal de GSH, tanto reduciendo la síntesis intracelular y la secreción como aumentando la degradación luminal, no descartándose efectos sobre los sistemas de transporte de tioles situados en la membrana de la microvellosidad.

332. (3664) DAPSONA (D) ALTERA EL FLUJO BILIAR INDEPENDIENTE DE SALES BILIARES (FBISB) EN LA RATA. VEGGI, LUIS; CROCENZI, FERNANDO; AGÜERO, RUT; ROMA, MARCELO; MOTTINO, ALDO

Inst. de Fisiología Experimental, Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, CONICET-UNR Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR

La D, fármaco usado en el tratamiento de lepra, malaria, etc, produce metaemoglobinemia y ocasionalmente hepatopatía, como efectos colaterales. En un modelo animal demostramos su efecto adverso sobre la velocidad de excreción (VE) biliar de sales biliares (SB). Se estudió aquí el efecto de D sobre el FBISB en ratas Wistar adultas de ambos sexos. Se administró D durante 4 días (30 mg /Kg peso; 2 veces por día; i.p.) o propilenglicol (vehículo de D) a los controles (C). Se midió el FBISB (estimado a través de la ordenada al origen en curvas de flujo biliar vs VE biliar de SB obtenidas de experimentos de infusión con tauroursodesoxicolato), sus determinantes (VE biliar de bicarbonato (HCO(-)[3]) y glutation total (GT)) y parámetros de estrés oxidativo hepático (VE biliar de glutation oxidado (GS-SG), y contenido hepático de GT y GS-SG). El FBISB (µL/min/g híg) disminuyó por D en ratas machos (D 1.29±0.13 vs. C 1.87±0.14; p<0,05; N=3) pero no en hembras (D 1.85±0.07 vs. 1.83±0.08; N=3). La VE biliar de HCO(-)[3] (nmol/min/g híg) disminuyó en ratas machos (D 45.6±4.5 vs. C 57.0±3.12; p < 0.05; N=4) y no en hembras (D 46.2±4.9 vs. C 45.5±5.5; N=4). La VE biliar de GT (nmol/min/g híg) aumentó en ratas machos (D 6.89±0.74 vs. C 3.06±0.21; p < 0.05; N=3) pero no en hembras (D 2.49±0.27 vs. C 2.60±0.23, N=3). La VE biliar de GS-SG (nmol/min/g híg) aumentó sólo en ratas machos (D 2.05±0.29 vs. C 0.22±0.06; p < 0.05; N=3) mientras que su contenido hepático no se modificó. En síntesis, se observó un efecto deletéreo de D sobre el FBISB sólo en ratas machos, mayormente debido a disminución de la VE biliar de HCO-3. El aumento de GS-SG biliar en estos animales sugiere asociación con estrés oxidativo, posiblemente inducido por el metabolito N-hidroxilado de D, sólo presente en machos.

333. (3765) SILIBININA PREVIENE LA ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA BOMBA EXPORTADORA DE SALES BILIARES BSEP INDUCIDA POR ESTRADIOL-17β-GLUCURÓNIDO EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS: ROL DEL AMPK. CROCENZI, FERNANDO; PORTESIO, MARÍA SOLEDAD; BASIGLIO, CECILIA LORENA; ROMA, MARCELO GABRIEL

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) - CONICET-UNR

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS: La silimarina, administrada in vivo, previene la colestasis por estrógenos. Puesto que estradiol-17β-glucurónido (E[2]17G) induce internalización de Bsep, estudiamos en duplas aisladas de hepatocitos (DAH) si silibinina (SB), componente activo de la silimarina, previene los cambios en la localización y función de Bsep inducidos por E[2]17G. MÉTODOS Y RESULTADOS: El % de DAH acumulando apicalmente el sustrato fluorescente de Bsep colli-

lisilfluoresceína (CLF) fue disminuido por E[2]17G (50 μ M). SB (2,5 μ M) previno completamente este efecto. El efecto beneficioso de SB fue abolido por el quelante de Ca(2+) intracelular BAPTA/AM, pero no por el inhibidor de PKA KT5720 (DAH acumulando CLF, % del control: E[2]17G: 43 \pm 2*; E[2]17G+SB: 93 \pm 1#; E[2]17G+SB+BAPTA/AM: 50 \pm 4*; E[2]17G+SB+KT5720: 92 \pm 3#; *p<0,05 vs control, #p<0,05 vs E[2]17G). E[2]17G indujo internalización endocítica de Bsep, visualizada por inmunofluorescencia; este efecto fue prevenido por SB (% de Bsep en el canalículo: Control: 69 \pm 2; E[2]17G: 38 \pm 3*; SB+E[2]17G: 59 \pm 3*#). Dado que silimarina es un potente inhibidor de la AMPc-fosfodiesterasa y que AMPc protege de la internalización de Mrp2 inducida por E[2]17G, analizamos si SB incrementa el AMPc intracelular en hepatocitos y si sus efectos son mimetizados por dibutilil AMPc (DB-AMPc). SB incrementó los niveles celulares de AMPc (+62 \pm 4%, p<0,05). DB-AMPc mimetizó la capacidad de SB para prevenir tanto la alteración en la acumulación apical de CLF como la internalización de Bsep inducida por E[2]17G. Más aún, el efecto beneficioso de DB-AMPc fue también dependiente de Ca(2+), pero no de PKA. CONCLUSIONES: Estos resultados sugieren que SB previene la falla excretora de sales biliares inducida por E[2]17G contrarrestando la internalización de Bsep, posiblemente por un mecanismo dependiente de las elevaciones de Ca(2+) intracelular inducidas por AMPc.

334. (3866) APOPTOSIS Y PROLIFERACION CELULAR EN GLANDULAS SUBMANDIBULARES (GSM) DE RATAS IRRADIADAS. DE LA CAL, C; CHIARENZA, A; LUCHELLI, M; VACAS, MI; VISIO, P; PAZ, D; RETTORI, VX; ELVERDIN, JC

Cátedra de Fisiología y Bioquímica Bucal de la Fac. Odontología, U.B.A Fac de Cs Exactas, XCFyBO (CONICET).

Entre de los procesos celulares que aseguran la supervivencia y renovación tisular, se destacan la proliferación y la apoptosis. La pérdida de la capacidad secretoria total o parcial en las glándulas salivales mayores es una de las secuelas comúnmente observadas en pacientes que han recibido terapia radiante de cabeza y cuello probablemente debido a cambios en los mecanismos antes mencionados. En nuestro trabajo hemos estudiado los efectos que la Radiación ionizante (Rx) tiene sobre esos dos procesos celulares en la GSM de rata. Se emplearon 2 grupos experimentales Control (GC) y Tratado (GRx), al que se le aplicó una dosis de 15 Gy en la región del cuello. Se evaluó a 1 h, 4 hs y 12 hs post Rx a) la apoptosis celular (técnica de TUNEL), b) la proliferación celular (técnica de PCNA) y c) a los 30 y 360 días post Rx, la respuesta secretoria mediante curvas dosis respuesta a noradrenalina (NA). Los resultados obtenidos (% de células marcadas por campo) nos permiten observar un incremento significativo de núcleos apoptóticos C: 0.17%, 1h:0.81%, 4hs:0.91%, 12hs:3.4% y de células PCNA+ localizada en su gran mayoría en los túbulos, C: 1.5%, 1h:1.66%, 4hs:13.42%, 12hs:14.2%. La respuesta secretoria para una dosis de 30 μ g/Kg. de NA disminuye a los 30 días de 52.5 \pm 7.4mg(GC) a 38.3 \pm 3.1mg (Rx). Al año post Rx, la hiposalia es aun mayor, disminuyendo de 48.6 \pm 8.2(GC) a 9.9 \pm 2.5mg en el GRx. En conclusión, la Rx induciría una disminución de la actividad funcional a pesar de observarse que el proceso de proliferación celular es superior al de apoptosis. Esto se debería a que aquella se ve localizada a nivel tubular, probablemente como reflejo de una alteración parácrina acino-tubular.

INMUNOLOGÍA VIII

335. (3269) EXPRESIÓN DE SLC (CCL21) EN DIFERENTES DERMATITIS POR CONTACTO HUMANAS. EBERHARD, YANINA; ORTIZ, SUSANA; KUNITZKY, RAQUEL; RUIZ LAZCANO, ALEJANDRO; SERRA, HORACIO MARCELO

Bioq. Clínica, Fac. Ciencias Químicas, UNC Dermatología, Hospital Privado Córdoba

CCL21 fue originalmente descripta como una quimiocina constitutiva responsable del reclutamiento de células CCR7+ a órganos linfáticos secundarios. En trabajos previos hemos demostrado un aumento de CCL21 en vasos linfáticos dérmicos en una forma de dermatitis humana mediada por linfocitos Th1/Tc1 (DAC). El objetivo de este trabajo fue investigar la participación de esta quimiocina en otra dermatitis por contacto, la irritativa (DIC), que se caracteriza por una respuesta inmune inespecífica. A tales fines, a 10 individuos se les indujo DIC con diferentes agentes químicos o físicos y a las 24 horas se estudiaron las respuestas macroscópicas y se extrajeron biopsias de piel de zonas afectadas y controles. También se realizó un estudio cinético de expresión de CCL21 tanto en DIC como en DAC en biopsias obtenidas a las 10 y 48 horas. Las biopsias fueron fijadas, incluidas en parafina y cortadas en forma seriada para estudios de histología e inmunohistoquímica con amplificación de señal (IHQ) con anticuerpos para CCL21 y Prox1(marcador de vasos linfáticos). EL infiltrado celular epidérmico de piel fue predominantemente polimorfonuclear en individuos con DIC y mononuclear en DAC corroborando la participación de diferentes mecanismos inmunológicos en estas dermatitis. Utilizando IHQA encontramos leve expresión de CCL21 en vasos linfáticos dérmicos (Prox-1+) en piel normal de todos los individuos y aumento de la producción de esta quimiocina 24 horas después de la aplicación del agente irritante. El estudio cinético mostró aumento de esta quimiocina a partir de 10 horas tanto en DIC como en DAC, lo que indica que CCL21 es mucho más que una quimiocina constitutiva ya que está involucrada en diferentes procesos inflamatorios dérmicos. La participación de esta quimiocina en condiciones fisiológicas e inflamatorias, como así también los mecanismos moleculares involucrados en la expresión aumentada observada en vasos linfáticos serán objeto de discusión.

336. (3435) RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES CIRCULANTES DE CITOCINAS PRO Y ANTI-INFLAMATORIAS Y HORMONAS DEL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIO-ADRENAL (HPA), EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA (AR). ONDELLI, FLAVIA MARÍA; MAHUAD, CAROLINA; BOTTASSO, OSCAR; DEL REY, ADRIANA; BESEDOVSKY, HUGO; BAY, MARÍA LUISA

Instituto de Inmunología, Fac. Cs. Médicas UNR Institute für Normale und Pathologische Physiologie, Marburg, Alemania

Previamente demostramos que los pacientes con AR presentaban niveles séricos aumentados de IFN- γ , IL-10 y TGF- β respecto a los controles sanos (Co). Dado que estos mediadores pueden actuar sobre el eje HPA modificando la producción de Cortisol (GC) y Dehidroepiandrosterona (DHEA), hormonas que a su vez desempeñan acciones inmunomoduladoras, se investigó la relación entre dichas citocinas y las referidas hormonas. Se incluyeron 31 pacientes (22 mujeres/9 varones) y 33 Co (19/ 14), edad media general 46.8 \pm 12.5 años. Los AR no se hallaban medicados con corticosteroides o DARMES y suspendieron la ingesta de anti-inflamatorios 10 días antes de la extracción de sangre (8:00 a.m). Determinaciones séricas: EIA (R&D, DRG). DHEA (media \pm ee nM), AR 10.3 \pm 1.2, Co 18.3 \pm 1.9, p=0.001; GC (nM) AR 309.3 \pm 18.7, Co 328 \pm 19 La relación entre GC, DHEA y las referidas citocinas fueron: GC/DHEA AR: 46 \pm 6.7, Co: 24.3 \pm 3, p<0.004; DHEA/TGF- β nM/ng.ml-1 AR: 0.026 \pm 0.003, Co: 0.05 \pm 0.006, p<0.001; DHEA/IL-10 nM/pg.ml-1 AR: 7.9 \pm 1.8, Co: 17.8 \pm 2.8, p=0.001; DHEA/IFN- γ nM/pg.ml-1 AR: 0.93 \pm 0.16, Co: 2.1 \pm 0.24, p<0.001. No se hallaron diferencias significativas para las relaciones entre Cort y citocinas excepto para GC/IL-10 nM/pg.ml-1 AR: 251 \pm 42.8, Co: 386 \pm 49, p<0.05. Un proceso inflamatorio importante como el que se evidencia en la AR no cursaría con activación acorde del eje HPA, permitiendo el supuesto de una relativa insuficiencia suprarrenal en los pacientes, con substancial deterioro en la producción de DHEA. El hecho de que el descenso de las relaciones hormonas/citocinas se verifique para citocinas con funciones inhibitoras y/o activadoras del eje HPA, sugiere que algunos de estos mediadores podrían estar desem-

peñando efectos inhibitorios sobre la producción de hormonas esteroideas a nivel adrenal.

- 337. (3447) ASOCIACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS SÉRICOS CONTRA EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR CON EL GRADO DE ACTIVIDAD DE LA ARTRITIS REUMATOIDEA.** PEREZ, GERMAN R (1); LUQUITA, A. (2,4); SVETAZ, M. (3); URLI, L. (2); VOLPINTESTA, R. (2); PALATNIK, S. (2); TABORDA, M. (1); GIRI, A. (1); RASIA, M. (2,4)

FAC. CS. BIOQ Y FARM. UNR (1) Area Virología. FCByF. UNR (2) Cat. Biofísica. FCs Med. UNR (3) Area Inmunidad Celular. FCByF. UNR (4) CIUNR

En trabajos previos, hemos demostrado que el aumento de la concentración sérica de ácido hialurónico (AH) en pacientes con artritis reumatoidea (AR) es el responsable de la pérdida de deformabilidad de los eritrocitos, siendo ambos fidedignos indicadores de actividad de la enfermedad. Desde hace 20 años, se sospecha del virus de Epstein-Barr (EBV) como factor desencadenante de la AR y de contribuir en su patogénesis. Objetivo: Relacionar los títulos de anticuerpos anti-EBV (Acs a-EBV) con el grado de actividad de la AR. Métodos: Se determinaron en 13 pacientes con AR los títulos de Acs a-EBV por inmunofluorescencia indirecta, la concentración sérica de AH ([AH]s) por ELISA y el índice de actividad por DAS28-4, cada método con los controles correspondientes. Resultados: (mediana, IC 95%) [AH]s [[controles]]: 20 10-45; [AH]s [[AR]]: 155 80-346 ($p < 0.0000$ vs controles). DAS28-4 [[controles]]: 2,08 1,68-2,35; DAS28-4 [[AR]]: 7,07 2,79-8,07 ($p < 0.0000$ vs controles). Acs a-EBV [[controles]]: 126 80-160; [[AR]]: 640 320-1280 ($p < 0.01$ vs controles). Coeficiente de Spearman (CS) ($r[[s]]$) entre DAS28-4 [[AR]] vs [AH]s [[AR]]: 0,83 ($p < 0.0000$ vs controles); CS ($r[[s]]$) entre DAS28-4 [[AR]] vs Acs a-EBV [[AR]]: 0,79 ($p < 0.01$ vs controles). Los valores obtenidos con el CS indicarían que los títulos de Acs a-EBV pueden ser asociados al grado de actividad de la AR determinado por el índice DAS28-4. Estos hallazgos permitirían sugerir la contribución de la infección por EBV en los mecanismos de autoinmunidad asociado a AR.

- 338. (3465) CARACTERIZACION FUNCIONAL E HISTOLÓGICA DE LA SIALADENITIS EN RATONES NOD.** ROSIGNOLI, FLORENCIA; ROCA, VALERIA; MEISS, ROBERTO; GOMARIZ, ROSA; PÉREZ LEIRÓS, CLAUDIA

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, CONICET Academia Nacional de Medicina. Depto Biología Celular, F de Biología, Universidad Complutense Madrid

La sialadenitis desarrollada por ratones diabéticos no obesos (NOD) es un modelo útil para estudiar mecanismos etiopatogénicos subyacentes en la sintomatología sicca característica del síndrome de Sjögren, donde se ha sugerido un origen nervioso más que inmune de la disfunción secretoria. El péptido intestinal vasoactivo (VIP), mensajero común de los sistemas nervioso e inmune, promueve respuestas secretorias y anti-inflamatorias. Previamente informamos una menor señalización estimulada por VIP en glándulas salivales de ratones NOD prediabéticos. Con el fin de investigar la progresión de la disfunción secretoria en relación a la aparición de alteraciones histológicas en órganos blanco de la respuesta autoinmune, se estudió la respuesta al VIP, la relación acinos/ductos, la presencia de infiltrados inflamatorios y otras alteraciones histológicas en glándulas de hembras NOD prediabéticas (10-26 semanas) y BALB/c como controles. Se determinó AMPc y GMPc por RIA, flujo salival in vivo inducido por pilocarpina y VIP. La histología de cortes teñidos con hematoxilina-eosina mostró: infiltrados mononucleares después de las 15 semanas en los NOD pero no en BALB/c. Se vieron imágenes apoptóticas y un aumento relativo de ductos en submaxilares de NOD desde las 10 semanas (15 semanas, ductos/campo x 40, $X \pm DS$, BALB/c: 20,5 \pm 2,3; NOD: 32,6 \pm 2,9, $p < 0,05$), con alteraciones de la estructura acinar y ductal. Dichas alteraciones no

se observaron en parótidas de NOD. Sin embargo, la reducida acumulación de AMPc estimulada por VIP es más evidente en parótidas de NOD a las 10 semanas (% de estimulación AMPc, BALB/c: 47 \pm 2; NOD: 21 \pm 3, $n=6$) que en submaxilares y a las 12 semanas se observa también en GMPc. La reducción del flujo salival por ambas glándulas se presenta desde las 12 semanas. Concluimos que la disfunción secretoria y la menor respuesta al VIP en glándulas de ratones NOD prediabéticos preceden a la aparición de infiltrados mononucleares y no se asocian con lesiones histológicas de las glándulas parótidas.

- 339. (3509) INFLUENCIA DE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA CRÓNICA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS BRONQUIOLARES DE CLARA.** ROTH, FELIX; URIBE, ELISA; AOKI, AGUSTIN; MALDONADO, CRISTINA

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

INTRODUCCIÓN: La célula bronquiolar de Clara (CC) secreta la proteína CC16, que inhibe a la fosfolipasa A2 y la migración de neutrófilos. Estudios previos indican que CC16 está disminuida en lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes asmáticos crónicos. **OBJETIVO:** Estudiar en un modelo murino, el efecto de la inflamación alérgica sobre la CC en el asma crónica, y determinar si los efectos pueden prevenirse mediante el tratamiento con budesonide (BD). **MATERIALES Y MÉTODOS:** Ratones hembra (cepa BALB/c), sensibilizados con ovoalbúmina por vía i.p. (días 0 y 14) y posterior exposición inhalatoria al alérgeno o a solución salina (25 min/día) siguiendo 2 esquemas diferentes: discontinuo, los días 24-26, 34, 43 y 52-54 (8 días en total), y continuo; los días 24-54 (30 días en total); en ambos esquemas, un 3° grupo recibió tratamiento con BD durante 25 min previos a la exposición al alérgeno. Se analizaron los niveles de CC16 por inmunocitoquímica y western blot, y la morfología celular a nivel óptico y electrónico. Para análisis estadístico se usó ANOVA y Tukey. **RESULTADOS:** La exposición crónica discontinua indujo una marcada hipertrofia de las CC; la detección de CC16 en LBA incrementó y predominaron eosinófilos. En cambio, en el tratamiento continuo las células disminuyeron y perdieron su cúpula característica, con figuras mieliformes típicas de células en regresión, y escasos gránulos secretorios; en LBA disminuyó significativamente el nivel de CC16 con un predominio de neutrófilos. En ambos grupos, el tratamiento previo con BD inhibió la presencia de células inflamatorias en el LBA; además, en el grupo crónico continuo BD indujo un aumento de las cúpulas típicas cargadas de gránulos secretorios. Estos resultados ponen en evidencia que la continuidad en la exposición al alérgeno determina alteraciones sobre las CC, disminución de CC16 y el consiguiente aumento de neutrófilos en LBA. En el esquema continuo, BD estimuló a las CC, indicando otro posible mecanismo de actividad antiinflamatoria de budesonide.

- 340. (3605) LPS Y PROTECCION FRENTE A SENSIBILIZACIONES DE TIPO ALÉRGICO.** ROMERO, YANINA; PIAZZON, ISABEL; KOBZIK, LESTER; GOLDMAN, ALEJANDRA

Escuela de Ciencia y Tecnología. Universidad de General San Martín ILEX-CONICET IHEMA Academia Nacional de Medicina, HSPH Harvard University

La incidencia de enfermedades atópicas depende de la interacción entre factores genéticos, epigenéticos y ambientales. La teoría higiénica postula que la incidencia de asma se ha incrementado a medida de que las condiciones higiénicas fueron mejorando. La ausencia de un modelo experimental sensible y relevante ha dificultado el estudio de efectos en la vida temprana de un individuo. Hipotetizamos que la exposición a LPS durante la vida temprana revierte la susceptibilidad heredada a través de la madre a desarrollar inflamación alérgica pulmonar. El modelo murino desarrollado utiliza crías provenientes de madres sensibilizadas con OVA "asmáticas" (asm), las que poseen una alta susceptibilidad a desarrollar inflamación alérgica pulmonar, a diferencia de las crías de madres normales (J.

Immunol. 170(4): 1683-9, 2003). Las crías de madres asm fueron sensibilizadas a los tres días de vida con OVA/Alum (ip, 5mg/1mg), seguidas de un desafío por vía aérea (OVA: 10 min, 3 días) a las 2 semanas. A las 48 hs. se observó un aumento significativo en el número y porcentaje de eosinófilos (Eos) en lavado broncoalveolar (BAL) respecto de las crías provenientes de madres normales (control negativo): $3,55 \pm 0,83$ vs $0,065 \pm 0,065$ (\pm ES, $p < 0,005$, $n=9$). Cuando las crías de madres asmáticas fueron inoculadas con LPS (2,5mg) por vía ip 30 min antes de la inoculación de OVA, el número y porcentaje de Eos en BAL disminuyó significativamente luego del desafío por vía aérea con el alérgeno, respecto de la cría de dichas madres sin LPS: $0,65 \pm 0,34$ ($p < 0,01$, $n=6$). La cría de madres normales inoculada con OVA LPS no mostró variaciones en los tipos celulares de BAL respecto del control negativo: $0,084 \pm 0,084$ (\pm ES, $n=7$). La histopatología de los pulmones del grupo proveniente de asm/ova mostró infiltración perivascular y peribronquial de células inflamatorias a diferencia del grupo control y el tratado con LPS. Los resultados muestran que la exposición temprana a LPS bloquea el desarrollo de una inflamación alérgica pulmonar en la cría susceptible de madres asmáticas.

341. (3692) INMUNOPATOLOGÍA DE LA MUCOSA RECTAL EN UN MODELO ANIMAL DE ALERGIA ALIMENTARIA. VINUESA, MIGUEL ANGEL; BASSAN, NORBERTO; ROMA, STELLA; PEREZ, FERNANDO

Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencia Médicas. UNR

La sensibilización vía sistémica y posterior desafío en distintos sectores del intestino delgado produce reacciones inflamatorias anafilácticas en el sector desafiado. En personas sensibilizadas el recto puede ser órgano de ingreso del antígeno (Ej. látex). El objetivo fue estudiar modificaciones inmunopatológicas en la mucosa rectal de conejo sensibilizado con Ovoalbúmina (OVA) y desafiado localmente con OVA. Treinta conejos se dividieron en tres grupos G1: normal; G2 sensibilizado por vía subcutánea con OVA y G3: sensibilizado y desafiado localmente con OVA y muestreados 4 horas post desafío. Se contaron 200 campos de mayor aumento en cada grupo. Los resultados se expresan como media aritmética por campo y error standard aplicándose student T test. En G3 se observó edema mucoso, linfangiectasias e infiltración de eosinófilos. Los resultados de las células inmunomarcadas fue: CD 4: G1: $8,3 \pm 0,06$; G2: $13,4 \pm 0,08$ y G3: $8,25 \pm 0,06$. CD 5: G1: $7,3 \pm 0,05$; G2: $9,4 \pm 0,05$ y G3: $11,3 \pm 0,06$. CD 25: G1: $13, \pm 0,08$; G2: $15,1 \pm 0,13$ y G3: $25,5 \pm 0,15$. cadena μ : G1: $10,4 \pm 0,06$; G2: $3,8 \pm 0,02$ y G3: $6,0 \pm 0,10$. RLA II (DR): G1: $11,6 \pm 0,05$; G2: $19,2 \pm 0,09$ y G3: $19,1 \pm 0,11$. G2 y G3 presentaron diferencia significativa versus G1 ($p < 0,001$) salvo para CD4. Observamos incremento en el número de células CD25+ (receptor interleuquina-2) en G3; disminución de células cadena μ positivas en G2 y G3, probablemente debido a la activación de células B y expresión de otros isotipos. Concluimos que la sensibilización y el posterior desafío con OVA producen modificaciones celulares cuantitativas pudiendo considerarse dichos valores como patrones, constituyendo un aporte al conocimiento de la inmunopatología de la reacción anafiláctica aguda local en la mucosa rectal de animales sensibilizados por vía sistémica.

342. (3731) ESTUDIO DE LA RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA EN CONEJOS SENSIBILIZADOS Y DESAFIADOS CON OVALBÚMINA (OVA) VÍA ORAL. INUESA, MIGUEL ANGEL; BERTOLLO, NATALIA; DIDOLI, GRISELDA; BASSAN, NORBERTO; BAY, MARIA LUISA

Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. UNR Instituto de Inmunología. Facultad de Ciencias Médicas. UNR

La ruptura de los mecanismos de tolerancia oral produce distintos procesos patológicos del tracto digestivo, como las enfermedades inflamatorias intestinales o los fenómenos de hipersensibilidad alimentaria. Para ahondar en los mecanismos

inmunológicos de la hipersensibilidad alimentaria, se estudió la respuesta blastogénica hacia el antígeno alimentario OVA, en suspensiones celulares de placas de Peyer (PP), ganglios mesentéricos (GM) o bazo, en conejos neocelandeses adultos jóvenes sometidos a sensibilización oral (OVAor- 150 mg OVA/20ml PBS, dos dosis cada 15 días) o sc (OVAAsc- 70 μ g OVA en 30 mg de alumbre/ml, dos dosis cada 15 días) y desafiados vía oral con 150 mg de OVA/20ml PBS (dOVA) 15 días después. Grupos experimentales: G1 (OVAor/dOVA); G2 (OVAAsc/dOVA); G3 (OVAAsc/dPBS); G4 (OVAor/dPBS); G5 (no sensibilizado-noS/dOVA); G6 (noS/dPBS), G5 y G6: Control. 24 hs posdesafío, se cultivaron 4X10⁵ cél/pocillo con OVA (200 μ g/ml) por 48, 72 y 120 hs. Resultados: diferencias en cpm entre cultivos estimulados y aquellos sin estimular (medias \pm ee; $n=5$). Para PP no se vieron diferencias entre los distintos grupos experimentales. GM: Proliferación en G2 fue siempre significativamente superior a Control; ej: 48 hs G2 (31124 ± 23678), Control (126 ± 114), $p=0.01$. Con esplenocitos se observó mayor blastogénesis respecto de Controles en G2 y G3 difiriendo significativamente, $p=0.03$. Los conejos G2 y G3 mostraron positivas las pruebas de anafilaxia cutánea pasiva y sólo G2 aumento en el número/campo microscópico de células CD25+ y eosinófilos en íleon. En las condiciones experimentales descriptas, sólo la sensibilización con OVA vía sc, activaría clones linfoides a nivel del bazo que frente a una exposición oral con el mismo antígeno migrarían e inducirían respuestas tipo TH2.

343. (3734) EFECTO DEL BENZIMDAZOL (BZL) SOBRE LA SÍNTESIS Y PRODUCCIÓN DE MEDIADORES PROINFLAMATORIOS EN ANIMALES CON ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL. PASCUTTI, MARIA FERNANDA; SANCEAU, JOSIANE; GUERMONPREZ, PIERRE; AMIGORENA, SEBASTIAN; WIETZERBIN, JEANNE; SERRA, ESTEBAN; BOTTASSO, OSCAR; REVELLI, SILVIA

Instituto de Inmunología Fac. Cs. Médicas UNR IBR - CONICET, Rosario, Argentina; Unité 520 y Unité 365 - INSERM, Paris, Francia.

El BZL se utiliza en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. En trabajos previos demostramos que, en ratones C57BL/6 desafiados con LPS, este compuesto también es capaz de disminuir la mortalidad, las concentraciones séricas de IL-6 y FNT- α y la síntesis del ARNm para la NOSi hepática. En el presente trabajo se evaluó si el tratamiento con BZL en el mismo modelo podía inhibir la producción de IL-6 en macrófagos peritoneales (MP) y la síntesis de otros ARNm para citoquinas proinflamatorias en hígado. Los ratones se dividieron en 4 grupos: CONTROL, BZL, LPS y LPS+BZL. El LPS se inoculó por vía ip, 200 μ g/animal. El BZL (200 mg/kg) se administró por vía oral, a las 18 y 2 horas antes del desafío con LPS. A los 45 min post-LPS se obtuvieron los MP, se sometieron a un doble marcaje (marcador de superficie + anticuerpo anti-IL-6) y se analizaron por citometría de flujo. A los 15, 30, 45 y 90 minutos post-LPS se obtuvieron los hígados y se extrajo el ARN total, que se sometió a una RT-PCR para IL-1 β , IL-6, FNT- α , IL-12 y NOSi. La cuantificación de los mensajeros se realizó respecto a un control interno coamplificado con el ARNm de interés. Los valores se expresan como % de intensidad de banda respecto de la banda control (media \pm d.s., $n=3$). El tratamiento con BZL en animales desafiados con LPS dio lugar a una disminución de los macrófagos IL-6(+). Por otra parte, el tratamiento con BZL provocó una reducción de los ARNm para IL-12 (90 min: LPS=70.0 \pm 16.3, LPS+BZL=38.6 \pm 3.8, $p=0.05$) y NOSi (90 min: LPS=39.5 \pm 5.5, LPS+BZL=10.7 \pm 2.2, $p=0.05$), mientras que los ARNm para las demás citoquinas permanecieron sin modificaciones. Estos cambios en la respuesta al desafío con LPS podrían servir para explicar la protección otorgada por el BZL en la endotoxemia experimental.

344. (3854) VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DE QUEMOQUINAS DE LA FAMILIA C-C Y DE SUS RECEPTORES EN EL TESTÍCULO DURANTE EL DESARROLLO

DE UNA ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (OAE). GUAZZONE, VANESA; RIVAL, CLAUDIA; DENDUCHIS, BERTA; LUSTIG, LIVIA

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Interesados en identificar las quemoquinas involucradas en el reclutamiento de células linfomononucleares en el testículo durante el desarrollo de la OAE, analizamos la expresión de MIP-1a (proteína 1-inflamatoria de macrófagos) y sus receptores CCR1 y CCR5. Los resultados se comparan con los obtenidos previamente con MIP-1b y MCP-1 (proteína 1-quemoattractante de monocitos). La OAE se indujo inyectando antígenos espermáticos y adyuvantes (grupo E) y sólo adyuvantes en el grupo control (C), sacrificándose las ratas a los 7,30,50 y 100 días (d). La lesión testicular (grupo E), focal a los 50d y extensa a los 100d, se caracteriza por un infiltrado intersticial linfomononuclear y apoptosis de espermátides y espermatocitos. Por ELISA, se observó un aumento de MIP-1a en el medio condicionado de macrófagos (MCM) de las ratas E durante el período previo al inicio de la lesión: E vs C (pg/ml/10(4)células) 7d: 455,43±20,68 vs 253,17±20,68 [p=0.0007], 30d: 508,41±50,36 vs 286,12±15,62 [p=0.0052]. Dicho aumento, aunque menor, se mantuvo en el MCM, a los 100d: E vs C: 345,15±25,25 vs 162,95±34,52 [p=0.05] y en el fluido testicular: E vs C (pg/ml), 10091±1318,60 vs 4512,30±1154,90 [p=0.04]. Por inmunohistoquímica, se detectó en E vs C, un aumento (3X) en la expresión de los receptores CCR1 y CCR5 en los macrófagos testiculares a los 30d mientras que a los 100d sólo CCR5 estaba aumentado(4X). Los resultados de MIP-1a comparados con los de MIP-1b y MCP-1, sugieren la existencia de una variación tiempo-dependiente en la expresión de estas quemoquinas y sus receptores. MIP-1a prevalece en el período inicial, MIP-1b en la fase final y MCP-1 durante todo el desarrollo de la OAE sugiriendo una función selectiva de las mismas en el reclutamiento de células linfomononucleares en el testículo.

345. (3858) EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATORIAS EN CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO EN RATAS CON ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL. RIVAL, CLAUDIA; THEAS, SUSANA; LUSTIG, LIVIA

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. UBA.

Hemos demostrado previamente en la orquitis autoinmune experimental (OAE), el aumento de células que expresan antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y en particular, el aumento de macrófagos testiculares residentes (ED2+) y no residentes (ED1+). Nuestro objetivo fue ampliar el estudio de las células presentadoras de antígeno en el testículo de ratas con OAE a través de la caracterización de moléculas co-estimuladoras de los macrófagos y la identificación de células dendríticas, poco estudiadas hasta el momento en el testículo. La OAE se indujo por inmunización activa con antígenos espermáticos y adyuvantes (E) y los animales fueron sacrificados a los 80 días de la primera inmunización, cuando la lesión testicular es severa. También se estudiaron ratas inyectadas solo con adyuvantes (C) y ratas no tratadas (N). Por inmunohistoquímica en macrófagos testiculares aislados se observó un aumento en el porcentaje de macrófagos B7-1+ de ratas con orquitis respecto de N y C (N: 48.8±5.4, C: 53.3±4.2, E: 68.3±1.6*; *p<0.05 vs N y C), mientras que no existieron diferencias entre N, C y E para B7-2 y B7h (B7-2: N: 89.9±1.4, C: 89.6±3.0, E: 91.5±1.7; B7h: N: 63.1±4.0, C: 77.0±1.1, E: 74.5±7.0). Las células dendríticas se identificaron por inmunohistoquímica en cortes de testículo mediante los marcadores OX62 y CD11c. En las ratas con OAE se observó un aumento de 2X en el número de células OX62+ y CD11c+ respecto de C. Los resultados sugieren que B7-1 estaría involucrado en la presentación antigénica de macrófagos en la OAE. Por otro parte, la identificación de células dendríticas en el intersticio testicular y su aumento en la OAE, sugieren que conjuntamente con los macrófagos estas células participarían activamente en la reacción de autoinmunidad.

346. (3883) APLICACIÓN DE UN NUEVO MODELO DE ELISA A LA DETECCIÓN SISTEMÁTICA DE AUTOANTICUERPOS CONTRA EL AUTOANTÍGENO IA-2IC. MARTINEZ, ANDREA VERÓNICA; PRIMO, MARÍA EVANGELINA; SICA, MAURICIO PABLO; ERMÁCORA, MARIO ROBERTO; POSKUS, EDGARDO

Cátedra de Inmunología, IDEHU-CONICET, Universidad de Buenos Aires Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes

El dominio intracelular de la proteína IA-2 (IA-2ic) es un autoantígeno principal en el diagnóstico y predicción de la diabetes autoinmune. Al presente, el test de unión de radioligando (conocido por su sigla inglesa RBA), aunque de uso restringido, es la técnica de referencia para la detección de los autoanticuerpos específicos contra IA-2ic (marcador IA-2A). En este trabajo aplicamos un nuevo modelo de ELISA para la detección sistemática de IA-2A que aprovecha la bivalencia del analito para capturarlo por uno de sus paratopes y revelarlo a través del otro. Para ello se tapizaron pocillos de ELISA con cantidades tales de IA-2ic recombinante que formaran monocapas incompletas del antígeno. Así, el efecto monogámico sobre la unión anticuerpo-antígeno inmovilizado fue mínimo y se favoreció la formación de complejos binarios que dejaran libre uno de los paratopes de la inmunoglobulina. Luego, el marcador se reveló por unión con IA-2ic-biotina soluble y estreptavidina-peroxidasa. Este modelo de ELISA (A) fue comparado con otro (B), desarrollado por nuestro grupo, que captura el anticuerpo con IA-2ic biotinilado e inmovilizado en monocapas de estreptavidina. El modelo A presentó un 76 % (16/22) de positividad con una población de sueros IA-2A-positivos por RBA, mientras que el B, un 83 % (19/23) (p < 0.01). Ninguno presentó falsos positivos con una población de sueros humanos normales (n = 30, p < 0.01). Además, el modelo A presentó una baja señal de fondo, a diferencia del B que, por tal motivo, requirió de un control para sustraer la señal de fondo de cada muestra. En conclusión, este trabajo presenta una herramienta de menor complejidad y costo para la detección del marcador IA-2A, válida tanto para el muestreo poblacional como para el laboratorio clínico.

347. (3950) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE IL-15 E IL-18 EN BIOPSIAS INTESTINALES PROVENIENTES DE PACIENTES CON ENFERMEDAD CELÍACA REFRACTARIA. PERIOLO, NATALIA; DI BIASIO, MARÍA BÁRBARA; DEMERGASSO, MARÍA JULIA; NIVELONI, SONIA ISABEL; MAURIÑO, EDUARDO; BAI, JULIO CÉSAR; CHERÑAVSKY, ALEJANDRA

Hospital de Clínicas "José de San Martín"- Servicio de Inmunogenética Hosp. Munic. de Gastroenterología "Dr. C.B. Udaondo". Dpto. Clínica Médica- Sección Intestino Delgado

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía del intestino delgado desencadenada en individuos genéticamente susceptibles (HLA DQ2/DQ8) luego de la ingestión de prolaminas (gluten), que generalmente remite ante la dieta libre de gluten (DLG). Sin embargo, no se logra remisión en un reducido grupo de pacientes celíacos denominados "refractarios" (ECR) los cuales deben ser sometidos a diversos tratamientos inmunosupresores. Objetivos: 1) evaluar la presencia de IL-18 e IL-15 en la mucosa intestinal de pacientes con ECR. 2) comparar la expresión de estas citoquinas centrales en la patología celíaca, entre pacientes con EC y ECR. Metodología: se purificó ARN total proveniente de 20 biopsias intestinales con 4,01 mg (0,13 – 10,8) correspondientes a 9 controles (C), 7 celíacos clásicos (CC) y 4 celíacos refractarios (CR) en las que se cuantificó la expresión de β -actina (112,14 pg promedio/ul ARN total; 1682 pg promedio/ biopsia). En base a dicha cuantificación, cada citoquina fue analizada por RT-PCR utilizando un rango de cDNA equivalente a 100 – 800 pg de β -actina. Resultados: se observó expresión de IL-18 en C y CC: 2/9 C y 3/7 CC (cDNA < 100 pg de β -actina) y 1/7 CC (339 pg de

β -actina). A pesar de la ausencia de transcritos de IL-18 en ECR con cDNA equivalente a 100-459 pg de β -actina, IL-15 se observó en 4/4 biopsias ECR entre 138-230 pg de β -actina. La falta de respuesta ante la dieta libre de gluten está asociada con la presencia de IL-15 en la mucosa intestinal. La ausencia de IL-18 podría indicar que esta citoquina no está involucrada directamente en el mantenimiento de la patología refractaria.

348. (3994) NUEVOS DISEÑOS DE ELISA PARA LA DETECCIÓN SISTEMÁTICA DE AUTOANTICUERPOS ANTI-GLUTAMATO DECARBOXILASA EN PACIENTES DIABÉTICOS CON AUTOINMUNIDAD. VILLALBA, ANABEL; VALDEZ, SILVINA; IACONO, RUBEN FRANCISCO; POSKUS, EDGARDO

Cátedra de Inmunología, FFyB, UBA Laboratorio de Inmunoenocrinología. Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

La Diabetes Mellitus (DM) tipo 1 y otras formas de DM asociadas a autoinmunidad son detectables precozmente a través de la determinación de autoanticuerpos (marcadores). El marcador más útil es el anticuerpo anti-glutamato decarboxilasa (GADA). El análisis de referencia para GADA es un test de unión de radioligando (RBA), de escasa difusión. El objetivo del trabajo fue desarrollar dos diseños de ELISA para la detección de GADA. El diseño 1 consistió en la preincubación de los sueros de pacientes con GAD recombinante biotinilada, expresada en un sistema eucariota de transcripción y traducción *in vitro*. La separación de los inmunocomplejos se realizó con Proteína A Sepharose y el antígeno libre residual fue capturado con un anticuerpo monoclonal unido a una fase sólida y posteriormente revelado con avidina peroxidasa. El diseño 2 consistió en la incubación de los sueros de pacientes con el antígeno quimérico con tiorredoxina (Trx-GAD), expresado en bacterias, adsorbido a la fase sólida. Luego se incubó con Trx-GAD biotina y los inmunocomplejos mixtos formados se revelaron con avidina peroxidasa. Los resultados de los dos tests frente a la técnica de referencia fueron los siguientes:

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Diseño 1	94 (n=57)	100 (normales, n=33)
Diseño 2	77 (n=26)	100 (normales, n=20)
RBA	100 (n=83)	100 (normales, n=53)

Las dos variantes propuestas para el análisis de GADA exhiben igual especificidad. La sensibilidad relativa algo mayor del diseño 1 respecto del diseño 2 se debe juzgar en balance con la simplicidad y factibilidad de automatización de este último al momento de decidir la elección del método para el screening rápido, masivo y económico del marcador.

INMUNOLOGÍA IX

349. (3448) EFECTO DEL NEUROPEPTIDO Y (NPY) Y LA NORADRENALINA (NA) EN LA QUIMIOTAXIS Y LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO DE MACRÓFAGOS Y LINFOCITOS PERITONEALES DE RATÓN. DE LA FUENTE, MÓNICA; GUAYERBAS, NOELIA; ALVARADO, CARMEN; PUERTO, MARTA

Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid

En el contexto de la comunicación entre el sistema nervioso y el inmunitario, en el presente trabajo se ha estudiado el efecto *in vitro* de un amplio rango de concentraciones de dos neurotransmisores del sistema nervioso simpático (SNS), la noradrenalina (NA) y el neuropeptido Y (NPY) por separado (10^{-12} , 10^{-10} y 10^{-8} M para el NPY; 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} y 10^{-6} M para la NA) y conjuntamente (10^{-10} M de NPY+ 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} y 10^{-6} M de NA) sobre la quimiotaxis (valorada en cámaras de Boyden) y la producción de

especies reactivas de oxígeno (ROS) (mediante fluorimetría) en macrófagos y linfocitos peritoneales de ratones BALB/c adultos. Los resultados indican que la quimiotaxis de macrófagos y linfocitos se ve estimulada por ambos neurotransmisores. Así, en el caso de macrófagos los índices de quimiotaxis fueron 279 ± 52 (control), 429 ± 69 (NPY 10^{-10} M), 407 ± 79 (NA 10^{-12} M) y 447 ± 95 (NPY 10^{-10} M+NA 10^{-12} M) ($p < 0,001$ respecto al control en todos los casos). En general, en macrófagos, el mayor efecto lo tiene el NPY mientras que en los linfocitos lo tiene la NA. En cuanto a los ROS, los efectos difieren según las células empleadas. Así, en los macrófagos se observó una estimulación de su producción: $139 \pm 22\%$ (NPY 10^{-10} M) ($p < 0,01$), $154 \pm 18\%$ (NA 10^{-10} M) ($p < 0,001$) y $184 \pm 22\%$ (NPY 10^{-10} M+NA 10^{-10} M) ($p < 0,001$) con respecto al control (100%) mientras que en los linfocitos, una inhibición: $67 \pm 6\%$ (NPY 10^{-10} M) ($p < 0,001$), $71 \pm 11\%$ (NA 10^{-10} M) ($p < 0,001$) y $81 \pm 15\%$ (NPY 10^{-10} M+NA 10^{-10} M) ($p < 0,01$). Se demuestra el papel modulador que tienen dos neurotransmisores que se coliberan del SNS sobre la funcionalidad de linfocitos y macrófagos. Este trabajo ha sido financiado en parte por un proyecto del MCYT (BFI 2001-1218).

350. (3527) LA INMUNIZACIÓN ORAL DE RATONES BALB/C CON OVA/CPG-DNA ESTIMULA CÉLULAS B DE GANGLIOS MESENTÉRICOS Y CAVIDAD PERITONEAL. ALIGNANI, DIEGO; MALETTO, BELKYS; LISCOVSKY, MIRIAM; PISTORESÍ-PALENCIA, MARÍA CRISTINA

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, U.N.C.

En estudios previos observamos que la inmunización oral con OVA/CpG-DNA induce en animales de 18 meses (18m-envejecidos) una respuesta específica con perfil Th1, pero con niveles de citoquinas menores a los de animales de 3 meses (3m-jóvenes). Los títulos de anticuerpos (IgAs e IgG) anti-OVA fueron similares en ambos grupos. Continuando estos estudios, analizamos el efecto de la inmunización oral con CpG-DNA sobre distintas poblaciones celulares en tejidos asociados a mucosa. Ratones BALB/c de 3m y 18m fueron inmunizados por vía oral con OVA/CpG-DNA (1mgOVA/50 μ g CpG-DNA/dosis/animal) en los días 0, 7 y 14. En ganglios mesentéricos, obtenidos 7 días post tercera inmunización, encontramos un aumento de la población CD19+ CD38+ B7-2+ con respecto a los no inmunizados (3m:7 veces; 18m:8veces) mientras que las células B, syndecan-1+ no se vieron afectadas. Por otro lado, la población CD3+CD45RB- que es mayor en animales de 18m no-inmunes (3m:21%, 18m:49%) no fue afectada por la inmunización. Los animales envejecidos no-inmunes presentaron, en lavado intestinal, mayores títulos de IgA anti flora comensal (log2 título: 3m: 1; 18m: 7,5). En cavidad peritoneal se observó aumento de la población CD19+ IgM+ CD5+ (3m:28%, 18m:41%) y mayores niveles de IL10 (3m: 442pg/ml, 18m: 2300pg/ml). Aunque la inmunización no afectó ni el nivel de Acs ni el porcentaje de esta población, cuando estas células fueron estimuladas *in vitro* con CpG-DNA secretaron mayor cantidad de IgM que los animales no-inmunes. En base a estos resultados podemos concluir que CpG-DNA, administrado por vía oral, estimula en animales envejecidos células B presentes en sitios relacionados a la respuesta inmune asociada a la mucosa intestinal, de manera similar a los animales jóvenes.

351. (3562) CPG-DNA, UN ADYUVANTE TH1, ESTIMULA LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ARGINASA EN MACRÓFAGOS. LISCOVSKY, MIRIAM; ALIGNANI, DIEGO; MALETTO, BELKYS; MONTES, CAROLINA; PISTORESÍ-PALENCIA, MARÍA CRISTINA

Facultad Ciencias Químicas - UNC Departamento de Bioquímica Clínica - Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba

Múltiples estudios demuestran la capacidad del DNA procariota con secuencias repetidas CG para estimular el sistema inmune. La actividad de macrófagos (M) frente a estímulos

microbianos debe ser efectiva, pero al mismo tiempo equilibrada para evitar daños en el organismo. En este trabajo se investigó el efecto in vitro del CpG-DNA sobre citoquinas y enzimas pro y antiinflamatorias de M. La producción de IL12, IL10 (ELISA) y óxido nítrico (ON) (Griess) se midió en sobrenadante de cultivo. La actividad de la enzima arginasa se determinó en lisado celular (método colorimétrico). En M de la línea celular J774, CpG-DNA estimuló con respecto al basal la producción de IL12 (450 pg/mL), pero no IL10 ni ON. Un aumento inesperado fue observado en la actividad de arginasa (índice=2). Se descartó la contaminación con LPS puesto que el efecto en la actividad de arginasa fue inhibido por Cloroquina (inhibidor de la vía de CpG) pero no por Polimixina B (inhibidor de LPS), se además el ensayo LAL resultó negativo. En M peritoneales (MP) de ratones BALB/c de distintas edades, CpG-DNA también estimuló la actividad de arginasa (índice=3) y la producción de IL10 (900 pg/mL). Cuando se utilizó como estímulo CpG-DNA más INF γ , se observó un incremento en la producción de IL12 (CpG-DNA: 600 pg/mL; CpG-DNA + INF γ : 750 pg/mL) y ON alcanzó niveles detectables (CpG-DNA: menor a 2 μ M, CpG-DNA + INF γ : 18 μ M); sin embargo, la actividad de arginasa no fue inhibida totalmente (índice=2). En conclusión, CpG-DNA induce en M la actividad de arginasa, enzima propuesta como reguladora de la producción de ON. Además, estimula en MP la producción de IL10. De este modo CpG-DNA, que in vivo induce una respuesta Th1, tendría la capacidad de autorregular esta respuesta estimulando en M factores antiinflamatorios.

352. (3579) NEUTRÓFILOS DE ANIMALES INMUNIZADOS CON OVA Y ADYUVANTE DE FREUND COMPLETO (CFA) TIENEN CAPACIDAD DE SINTETIZAR CITOQUINAS. MALETTO, BELKYS ANGÉLICA; LISCOVSKY, MIRIAM; ALIGNANI, DIEGO; RÓPOLO, ANDREA; MORÓN, GABRIEL; PISTORESÍ-PALENCIA, MARIA CRISTINA

Facultad Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba

Los granulocitos neutrófilos (Ne) son considerados células diferenciadas con escasa capacidad de síntesis proteica. Sin embargo, estudios recientes están cambiando este concepto. En este trabajo estudiamos la participación del Ne in vivo durante una respuesta inmune adaptativa inducida con OVA-CFA. Se inmunizaron ratones con OVA-CFA (60 μ g/dosis/animal) en los días 0, 15 y 30. El perfil de respuesta de células de ganglio linfático cultivadas con OVA mostró una predominancia Th1 (INF γ : 7 ng/ml/IL-5: 0.5 ng/ml). Diez días post-tercera inmunización, los ratones fueron inyectados en la pata con OVA-FITC (grupo I) o PBS (grupo II). A las 6h post inyección analizamos por FACS la composición celular en ganglios poplíteos (gp). En los gp del grupo I observamos un infiltrado de Ne, positivos para OVA-FITC. Este influjo de Ne es dependiente de la presencia de anticuerpos anti-OVA, mediado por la unión a Fc γ RIII/II (analizado por experimentos in vitro) y transitorio, desaparece a las 24h. En relación a este estado transitorio, 18h post inyección el 11porciento de los Ne presentaron ADN hipodiploide representativo de muerte por apoptosis. El análisis por FACS de citoquinas intracelulares en Ne sanguíneos (células Ly-6G^{high}) muestra que los Ne de los grupo I y II expresaron TNF- α (70 y 11 porciento), INF-gama (10 y 4 porciento), IL-12 (2 y 1porciento) y no expresaron IL-4, mientras que Ne de animales no-inmunes inyectados con PBS no expresaron ninguna de estas citoquinas. Los Ne presentes en gp contenían INF-gama e IL-12 y fueron negativos para IL-4. Estos resultados indican que cuando se inmuniza con OVA-CFA los Ne se acumulan transitoriamente en un órgano linfático secundario y producen citoquinas inmunoregulatorias comprometidas en el perfil Th1 inducido por CFA en estos animales.

353. (3592) LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA, QUIMIOTAXIS Y FAGOCITOSIS DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES VARÍA CON LA EDAD. GOLDMAN, ALEJANDRA; TASAT, DEBORAH R

Escuela de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de General San Martín Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de General San Martín

El pulmón es el blanco más importante de la exposición a una gran variedad de agentes del medio ambiente, tales como microorganismos, alérgenos o sustancias tóxicas. La población menor de 2 años es una de las más vulnerables al riesgo de infecciones pulmonares. En este grupo etario se demostró que la función T y B está disminuída, sin embargo, es discutido que existan cambios en la capacidad funcional del linaje monocito/macrófago. En trabajos previos demostramos una respuesta diferencial, en función de la edad del animal, en la producción de anión superóxido (O₂⁻) por célula, de factor de necrosis tumoral- α y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En este trabajo analizamos la capacidad de adhesión, capacidad fagocítica y actividad quimotáctica de macrófagos alveolares en ratas Wistar jóvenes (J: 1-1/2 meses), intermedias (I: 3-7 meses) y adultas (A:10-12 meses). Los ensayos de adhesión muestran que el porcentaje de adherencia es significativamente menor en ratas jóvenes respecto de los otros dos grupos: 51,96 \pm 2,68 (J) vs 74,91 \pm 3,24 (I) y 69,6 \pm 4,06 (A) (% \pm ES, n=6, p<0,001). Asimismo, el porcentaje de fagocitosis en el grupo joven fue significativamente menor respecto del encontrado para las células de los grupos intermedios y adultos. Sin embargo, las diferencias entre estos últimos dos grupos no fueron significativas: 12,95 \pm 3,61 (J) vs 27,55 \pm 3,73 (I) y 23,61 \pm 3,68 (A) (% \pm ES, n=6; p<0,01 respecto de I y p<0,05 respecto de A. Resultados preliminares obtenidos en ensayos de quimiotaxis frente a C5a indicarían una igual migración entre jóvenes y adultos, siendo los valores basales de éstos últimos más altos. Estos resultados muestran cambios en la funcionalidad de los macrófagos alveolares en función de la edad que podrían dar cuenta, eventualmente, de la mayor susceptibilidad a agentes externos en la población de menor edad.

354. (3604) EL PÉPTIDO FORMILADO N-FORMIL-METIONIL-LEUCIL-FENILALANINA (FMLP) INHIBE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES FCGAMMA EN MONOCITOS Y MACRÓFAGOS ACTIVADOS POR IFN-G. BEIGIER BOMPADRE, MACARENA; BARRIONUEVO, PAULA; ALVES ROSA, FERNANDA; RUBEL, CAROLINA; PALERMO, MARINA; ISTURIZ, MARTÍN

Academia Nacional de Medicina División Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina.

Los receptores para la porción Fc de IgG (Fc γ Rs) cumplen un rol importante en la respuesta inflamatoria. En trabajos anteriores demostramos que si se incuban monocitos humanos con IFN-g (240U/ml) por 24h y luego con FMLP (1x10⁻⁶M) durante 2h, se inhibe el aumento en la expresión del Fc γ RI inducido por IFN-g. En este trabajo observamos que este efecto del FMLP se correlaciona con la inhibición de funciones dependientes de Fc γ Rs como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los resultados se expresan como % de ADCC del control \pm SEM: FMLP: 108 \pm 10; IFN-g: 480 \pm 189*; IFN-g + FMLP: 123 \pm 13, *p<0.01. El efecto del FMLP es abolido por los inhibidores de proteasas PMSF y fosforamidón, que inhiben serin y metaloproteasas respectivamente. La expresión del Fc γ RI fue evaluada por citometría de flujo en monocitos humanos purificados por Percoll. También demostramos que sobrenadantes de PMN tratados con FMLP durante 3h inducen la disminución de la expresión del Fc γ RI cuando son agregados a monocitos naive. Los resultados se expresan como % de MIF del control \pm SEM: control: 100; FMLP: 70 \pm 5*; p<0.05. Este efecto es abolido por el inhibidor de serin proteasas PMSF. En un modelo murino de inflamación crónica se demostró que el FMLP es capaz de disminuir la expresión del Fc γ RI/II en macrófagos previamente tratados con IFN-g (MIF: control: 434 \pm 26; FMLP: 405 \pm 22; IFN-g: 410 \pm 60; IFN-g + FMLP: 229 \pm 10*; p<0.05). Estos resultados proponen un nuevo mecanismo por el cual el FMLP puede modular la actividad de los monocitos/macrófagos durante las infecciones bacterianas.

355. (3658) GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DENDRÍTICA PLASMACITOIDE POR ACIDOSIS EXTRACELULAR. VERMEULEN, MÓNICA; TREVANI, ANALÍA; GAMBERALE, ROMINA; ALVAREZ, MARÍA EUGENIA; FERNÁNDEZ-CALOTTI, PAULA; SANJURJO, JULIETA; SALAMONE, GABRIELA; RAIDEN, SILVINA; GIORDANO, MIRTA; GEFFNER, JORGE

IIHema, Academia Nacional de Medicina IIIHema, Academia Nacional de Medicina. Dto de Microbiología. Facultad de Medicina. UBA

Se obtuvieron células dendríticas (CD) por cultivo de precursores de médula ósea de ratones C57/Bl6, en presencia de GM-CSF, por 9 días, a pH 7.3. Durante el transcurso de experiencias dirigidas a evaluar el impacto de la acidosis extracelular sobre la sobrevivencia de CD privadas de GM-CSF encontramos, inesperadamente, que en aquellos cultivos desarrollados en medio ácido (pH = 6.5-6.7), pero no en aquellos llevados a cabo en medio neutro (pH = 7.2-7.4), se originó al cabo de 4 semanas adicionales de cultivo una línea celular (MV) de alta tasa replicativa con un fenotipo propio a CD plasmacitoides (se indican entre paréntesis las intensidades medias de fluorescencia): CD11c+ (25±9), GR-1+ (53±12), CD40+ (48±11), CD86+ (45±11), CMH clase II+ (376±53), CD8+ (24±6), B220+ (449±38) y CD19 - (13±4) (control isotipo 12±4, n=3). El cultivo de la línea mostró no requerir el añadido de factores de crecimiento, por períodos tan prolongados de tiempo como 2 meses, lo que sugiere la producción de factores autócrinos promotores de la proliferación. Teniendo en cuenta esta observación, se ensayaron los sobrenadantes de la línea MV sobre cultivos de médula ósea. En franco contraste con los cultivos desarrollados en presencia de GM-CSF, que conducen a la obtención de CD mieloides observamos, al cabo de 9 días, que más del 90% de las células obtenidas presentaron un fenotipo compatible con CD plasmacitoides. El interés de nuestros resultados radica, no sólo en que la línea desarrollada podría representar un modelo útil a fin de analizar la fisiología de las CD plasmacitoides, sino también en la posibilidad de que la acidosis extracelular constituya un estímulo capaz, per sé, de inducir mecanismos transduccionales conducentes a la modulación de eventos claves involucrados en los procesos de diferenciación y proliferación celular.

356. (3659) VÍAS TRANSDUCCIONALES ACTIVADAS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS POR ACIDOSIS EXTRACELULAR. GAMBERALE, ROMINA; GEFFNER, JORGE; GIORDANO, MIRTA; AMIGORENA, SEBASTIÁN; VERMEULEN, MÓNICA

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina IIIHema, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires. Instituto Curie, Paris, Francia.

Numerosos procesos inflamatorios de diferente etiología transcurren a valores ácidos de pH extracelular, comprendidos entre 6.2-7.0. Previamente demostramos que la acidosis extracelular induce un marcado incremento en la endocitosis mediada por células dendríticas murinas (CD). Asimismo, observamos que el pH ácido favoreció la presentación de antígenos extracelulares vía MCH de clase I, incrementando, además, la respuesta humoral antígeno específica. Se ha reportado que el pH ácido activa la vía de las MAPK en varias líneas tumorales. Por otra parte, ha sido descrito que valores ácidos de pH disparan la activación de la PLC en fibroblastos y células endoteliales humanas. El objetivo del presente trabajo consistió en caracterizar las vías transduccionales activadas en CD a consecuencia de su exposición a valores ácidos de pH extracelular. A tal efecto, incubamos la línea celular D1 (CD inmaduras de origen mieloides) a pH neutro (7.3) y ácido (6.5) por distintos tiempos y la activación de diversas vías de señalización se analizó por Western Blot. Nuestros resultados indican que la acidosis extracelular indujo la fosforilación de las MAPK ERK1/2 pero no de p38. Observamos, además, fosforilación de Akt, sugiriendo la activación de PI3K. No observamos inducción alguna de transientes citosólicos de calcio,

sugiriendo que la PLC no se activaría por acidosis extracelular. Nuestros resultados sugieren que la acidosis extracelular activa selectivamente vías de señalización que han demostrado jugar un papel crítico en la fisiología de las CD.

357. (3678) LA FLUDARABINA INDUCE LA ACTIVACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NF-KB Y AP-1 EN CÉLULAS MONOCÍTICAS Y LINFÓIDES. FERNANDEZ CALOTTI, PAULA; COSTAS, MÓNICA; GAMBERALE, ROMINA; SANJURJO, JULIETA; SÁNCHEZ AVALOS, JULIO; GEFFNER, JORGE; GIORDANO, MIRTA

Laboratorio de Inmunología Oncológica, Academia Nacional de Medicina Instituto Lanari, Hospital de Clínicas

La fludarabina (FLU) es un análogo de adenosina utilizado en el tratamiento de leucemias y como inmunosupresor. Anteriormente habíamos reportado que la inducción de apoptosis por FLU en células monocíticas se asocia con la secreción de IL-8. El objetivo de este trabajo fue determinar si FLU es capaz de activar a los factores de transcripción NF-kB y AP-1, ambos involucrados en la regulación del gen de IL-8. Para ello se realizaron ensayos de EMSA en células monocíticas U937 y en linfocitos B de leucemia linfática crónica (LLC-B) tratados con dosis subapoptóticas de FLU: 0.5-2 µM para U937 (n=6) y 20 µM para LLC-B (n=5-7). En los dos tipos celulares FLU indujo la activación de NF-kB a los 45 minutos de exposición, la cual se mantuvo por al menos 3 horas. La especificidad de las bandas detectadas fue confirmada por ensayos de supershift con anticuerpos contra las proteínas p50 y p65. Resultados similares se observaron en relación a AP-1 confirmando la especificidad de la banda detectada por EMSA con anti c-Jun. La activación de NF-kB y AP-1 por FLU se inhibió marcadamente con el antioxidante N-acetil cisteína (10 mM) y en forma parcial con el inhibidor de la vía de ERK (PD98059, 5µM) y de la vía de p38 (SB203580, 5µM). Por el contrario, el inhibidor de PI3K (Wortmannin, 1µM) no tuvo efecto. Por ensayos de citometría de flujo observamos que FLU también es capaz de incrementar, en células U937, la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1, otra proteína regulada por NF-kB y AP-1: media de intensidad de fluorescencia: 105±15 vs 250±27, controles vs FLU, media±ES, n=3, p<0.01. En conclusión, nuestros resultados indican que FLU en dosis subapoptóticas activa los factores de transcripción NF-kB y AP-1 en células U937 y LLC-B, incrementando la expresión de proteínas como IL-8 e ICAM-1.

358. (3679) REGULACIÓN POR IL-4 DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS RELEVANTES EN EL TRANSPORTE Y ACTIVACIÓN DE FLUDARABINA. FERNANDEZ CALOTTI, PAULA; GALMARINI, CARLOS; GAMBERALE, ROMINA; SANJURJO, JULIETA; GEFFNER, JORGE; GIORDANO, MIRTA

Laboratorio de Inmunología Oncológica, Academia Nacional de Medicina Facultad de Médecine Rockefeller, Lyon, Francia

La fludarabina (FLU) es un análogo de adenosina utilizado para el tratamiento de leucemia linfática crónica de células B (LLC-B), cuyo ingreso a las células se produce exclusivamente a través del transportador equilibrativo hENT1. Dado que la actividad pro-apoptótica de FLU es inhibida por IL-4, quisimos determinar si este efecto podría atribuirse a una disminución en la expresión de hENT1. Para ello evaluamos los niveles de ARNm para hENT1 por PCR cuantitativa en tiempo real en extractos obtenidos de células de pacientes LLC-B (n=7) incubadas in vitro con IL-4 durante 48 hs. A diferencia de lo esperado, encontramos que la IL-4 aumenta dramáticamente (10 veces) la expresión de hENT1 en células LLC-B. Teniendo en cuenta que, una vez que FLU ingresa a la célula su actividad depende de la relación entre la kinasa que la activa (dCK) y la nucleotidasa que la cliva (cNII), evaluamos los niveles de ambas enzimas en células tratadas o no con IL-4. Encontramos una relación cNII/dCK disminuída en las células tratadas con IL-4, lo que indica que la inhibición de la apoptosis inducida por IL-4 no puede atribuirse a un catabolismo

exacerbado de FLU. Finalmente se analizaron los mismos parámetros en células B normales purificadas a partir de amígdalas (n=6). Se observó que la IL-4 no modifica la expresión de ARNm para hENT1, pero aumenta la relación cNII/dCK, lo que podría explicar su capacidad para inhibir la apoptosis inducida por FLU en células B normales. En conclusión nuestros resultados demuestran que la expresión de las principales moléculas involucradas en el transporte y metabolismo de FLU es regulada de forma diferente por IL-4 en linfocitos B normales y leucémicos. En células LLC la inhibición de la actividad proapoptótica de FLU por IL-4 no puede atribuirse al menor ingreso y activación del análogo dentro de la célula.

359. (3691) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA PROMOCIÓN DE LA APOPTOSIS MEDIADA POR TNF- α EN GRANULOCITOS NEUTRÓFILOS. SALAMONE, GABRIELA; COSTAS, MONICA; ALVAREZ, MARÍA EUGENIA; TREVANI, ANALÍA; SANJURJO, JULIETA; VERMEULEN, MÓNICA; IGUAIN, ANA PAULA; GIORDANO, MIRTA; GEFFNER, JORGE

IIHema, Academia Nacional de Medicina IIHEMA, Academia Nacional de Medicina. Instituto de Investigaciones A. Lanari. Fac. Medicina. UBA.

Previamente demostramos que el TNF- α ejerce un poderoso efecto priming sobre el desarrollo del proceso apoptótico en el neutrófilo, permitiendo a diversos agonistas actuar como poderosos promotores de la apoptosis. Aquí, analizamos los mecanismos involucrados. Mediante ensayos de gel shift observamos que la translocación de NF- κ B al núcleo se incrementó cuando las células fueron pretratadas con TNF- α (10 ng/ml) y luego expuestas a Zimosán (Z:50mg/ml), en relación a lo observado en las células sólo expuestas a TNF- α o Z. Encontramos, además, que el inhibidor de NF- κ B sulfasalazina (20mM), indujo un incremento en el porcentaje de células apoptóticas en células tratadas con TNF- α + Z (n=5, 30 \pm 6 vs 40 \pm 4, p< 0.05). Ambos resultados indican que el efecto promotor de la apoptosis mediada por TNF- α no se asocia a un impedimento en la actividad de NF- κ B. Evaluamos, además, la participación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis mediante los inhibidores específicos para caspasas 8, 3 y 9 (50mM). Los tres inhibidores disminuyeron significativamente (p<0.01) los porcentuales de apoptosis en neutrófilos pretratados con TNF- α y luego expuestos a Z, IgG inmovilizada (IgGi) y GM-CSF (100 ng/ml). Ensayos realizados mediante el empleo del colorante Rodamina 123 y citometría de flujo mostraron en las células pretratadas con TNF- α y luego expuestas a IgGi una notoria reducción (p < 0.05) en la incorporación del colorante, frente a lo observado en células tratadas sólo con TNF- α o IgGi (intensidades medias de fluorescencia: 815 \pm 74, 1276 \pm 204 y 1319 \pm 188, respectivamente (n=4), sugiriendo la inducción de alteraciones en el potencial transmembrana mitocondrial, proceso que se asoció a una marcada reducción (p<0.001) en la expresión de la molécula anti-apoptótica Mcl-1. Nuestros resultados sugieren que el efecto priming del TNF- α se asocia al reclutamiento de la vía intrínseca promotora de la apoptosis.

360. (3712) MODULACIÓN DE LA APOPTOSIS LEUCOCITARIA Y LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF κ B POR ÁCIDO HIALURÓNICO Y EL ANTICUERPO ANTI-CD44 IM7 EN ZYMOZAN AIR-POUCH MURINO. CABRERA, PAULA; ALANIZ, LAURA; GARCÍA, MARIANA; LUZZI, RENATA; HAJOS, SILVIA; ÁLVAREZ, ÉLIDA; BLANCO, GUILLERMO

IDEHU - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA

La extensión del infiltrado inflamatorio puede ser afectada por varios agentes que modifican el nivel de apoptosis leucocitaria mediante la inducción de señales intracelulares. Nuestro objetivo fue evaluar la modulación de la apoptosis leucocitaria por parte de ácido hialurónico (AH) a través de su

receptor CD44 y su correlación con la activación del factor NF κ B en el exudado inflamatorio de air-pouch zymosan murino. Se inyectó AH de bajo peso molecular (AH-BPM), de alto peso molecular (AH-APM), o anticuerpo IM7 a las 40hs posteriores a la inyección de zymosan en el air-pouch. Se evaluó la apoptosis de leucocitos por microscopía de fluorescencia y fragmentación de DNA y la activación de NF κ B por EMSA 8hs y 4hs más tarde respectivamente. La inyección de AH-BPM no modificó el porcentaje de leucocitos apoptóticos con respecto a los controles inyectados con PBS (4.3 \pm 0.6; 6.5 \pm 1.3). Sin embargo AH-BPM produjo un incremento en la activación de NF κ B con respecto al mismo control. La inyección de AH-APM aumentó el porcentaje de leucocitos apoptóticos con respecto a los controles (14.6 \pm 6.3 vs. 6.5 \pm 1.3) y produjo una disminución en la activación de NF κ B. La inyección de IM7 produjo un aumento en el porcentaje de leucocitos apoptóticos con respecto a los controles con PBS o IgG de rata (26.0 \pm 8.3 vs. 6.5 \pm 1.3 vs. 3.9 \pm 4.1). Concluimos que el AH bajo la forma de AH-APM incrementa la apoptosis de leucocitos en el exudado inflamatorio de zymosan air-pouch, al igual que el bloqueo del receptor CD44 mediante el anticuerpo IM7. En cambio, la inyección de AH-BPM no modifica los niveles de apoptosis aunque incrementa de manera importante la activación de NF κ B. La modulación de la apoptosis leucocitaria por AH-APM y anti-CD44 sería relevante en el control del infiltrado inflamatorio.

361. (3746) MECANISMOS TRANSDUCCIONALES INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS POR ADN BACTERIANO. ALVAREZ, M EUGENIA; FERNÁNDEZ CALOTTI, PAULA; FUXMAN BASS, JUAN; VERMEULEN, MÓNICA; GAMBERALE, ROMINA; SALAMONE, GABRIELA; GEFFNER, JORGE; COSTAS, MÓNICA; LONGO, ENRIQUE; TREVANI, ANALÍA

Academia Nacional de Medicina

Previamente hemos demostrado que el ADN bacteriano induce la activación de neutrófilos humanos a través de un mecanismo que es CpG-independiente y que no involucra la participación del receptor de Tipo Toll 9. En este trabajo hemos investigado los mecanismos transduccionales responsables de dicha activación. El incremento en la producción de IL-8 y en la expresión de CD11b inducidos por estimulación de neutrófilos con ADN bacteriano (100 μ g/ml), fue significativamente inhibido por acción de los inhibidores farmacológicos, SB203580 (inhibidor de P38 MAPK; 5 μ M) y PD98059 (inhibidor de la vía de MEK1/ERK; 5 μ M) (n=4-6; p<0,05). La participación de las vías de MEK1/ERK y p38 MAPK fue corroborada por la detección de las formas fosforiladas de ERK y P38 MAPK por Western blot. La activación de neutrófilos con ADN bacteriano no indujo la movilización de calcio intracelular evaluada por citometría de flujo, ni parece involucrar a la vía de la PI3K, pues tanto el cambio de forma como el shedding de L-selectina inducidos por ADN bacteriano no fueron inhibidos por wortmanina (1 μ M). Siguiendo a la estimulación de neutrófilos con ADN bacteriano (100 μ g/ml), también se observó mediante ensayos de electroforesis de retardo en geles, la translocación al núcleo de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. Sin embargo, tanto la estimulación de la producción de IL-8 como el aumento en la expresión de CD11b por ADN bacteriano no fueron afectadas por el inhibidor de la activación de NF- κ B, sulfasalazina (25 μ M; n=6), sugiriendo la posible participación de un mecanismo de transactivación a través de AP-1. Estos resultados podrán contribuir a dilucidar la naturaleza del putativo receptor involucrado en la activación de neutrófilos por ADN bacteriano

362. (3796) LPS INDUCE CAMBIOS FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES EN CÉLULAS JHU-4 PRÓSTÁTICAS, SUGIRIENDO UN ROL DE LAS MISMAS EN LA INMUNIDAD INNATA. GATTI, GERARDO; ANDREANI, V; MACKERN, JP; MOTRICH, R; RIVERO, V; MACCIONI, M

Bioquímica Clínica. Fac. Cs. Químicas. UNC Depto. Bioquímica Clínica. Fac. Ciencias Químicas. UNC

Numerosas evidencias sugieren que las células epiteliales participan activamente en la inmunidad innata, cumpliendo funciones tradicionalmente adjudicadas a macrófagos, células dendríticas y células de origen mieloide. Dado que *E. coli* es una causa importante de infecciones en el tracto genitourinario, analizamos la capacidad de responder al LPS de *E. coli* 055:B5, por parte de células del epitelio prostático, con el objetivo de determinar si éstas son capaces de detectar tempranamente una infección. Así, células JHU-4 de próstata de rata fueron cultivadas a distintos tiempos en presencia o ausencia de cantidades crecientes de LPS y su fenotipo y capacidad de secretar mediadores proinflamatorios fueron evaluados. La viabilidad celular fue mayor al 90% en todos los casos (Trypan Blue). Por citometría de flujo, se pudo observar un aumento en el porcentaje e intensidad de fluorescencia (Canal Medio Fluorescencia) de células MHC clase I+ (de 27.7% a un 47.5%; CMF: de 19.05 a un 22.15) y de células ICAM1+ (de un 51.4% a un 96.9%; CMF de 22.35 a 135.61) al ser cultivadas en ausencia o presencia de 100 µg/ml de LPS por 72 hs respectivamente. No se evidenció un aumento en la expresión de MHC clase II. El nivel de nitritos en los sobrenadantes de cultivo fue medido por la reacción de Griess, aumentando significativamente ($p < 0.05$) a las 72hs de cultivo (basal: 8.70 ± 2.53 mM; 27.42 ± 1.12 mM, 19.31 ± 0.28 mM, 21.27 ± 0.1 mM para concentraciones de 50, 100 y 200 µg/ml de LPS respectivamente). De la misma manera, los niveles de TNF α se incrementaron significativamente ($p < 0.05$) a partir de las 48 hs de cultivo para todas las dosis de LPS ensayadas (basal: 4.82 ± 0.81 pg/ml; 15.14 ± 0.47 , 30.79 ± 0.23 , 54.64 ± 2.15 pg/ml respectivamente). Nuestros resultados demuestran que las células epiteliales prostáticas responden a LPS bacteriano, facilitando la detección temprana de bacterias que puedan llegar a próstata por reflujo urinario.

363. (3999) LA ELASTASA PRODUCIDA POR LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES MODULAN LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LAS CELULAS DENDRÍTICAS. MAFFIA, PAULO; ZITTERMANN, SANDRA; SCIMONE, LUCILA; BUZZOLA, FERNANDA; TATEOSIAN, NANCY; BARBOSA, MARCOS; CHULUYAN, EDUARDO

Inmunogenética. Hospital de Clínicas. UBA

Resultados previos en nuestro laboratorio demostraron que los leucocitos polimorfonucleares (PMNL) disminuían la capacidad inmunoestimuladora de las células dendríticas (CDs); efecto mediado por el aumento de TGF β . El objetivo del presente trabajo fue determinar los mecanismos involucrados en el fenómeno y la especificidad del mismo. Para ello CDs, generadas a partir de monocitos humanos, fueron expuestas a sobrenadantes de cultivo (SC) de PMNL activados (PMNL α) con IL-8. Las CDs tratadas con los SC de PMNL α mostraron una menor capacidad aloestimuladora de LT ($42 \pm 14\%$, $n=8$ $p < 0.05$) y un aumento en la producción de TGF β , tal como se describió previamente (Medicina 61:5/2, 750, 2001). El efecto de los SC de PMNL sobre las CDs fue parcialmente revertido por PMSF (37% inhibición), un inhibidor de serino proteasas. Para establecer el rol de éste grupo de enzimas presente en los gránulos de PMNL, tratamos a las CDs con 0.2U/ml de elastasa (serino proteasa presentes en los PMNL). Al igual que los SC de PMNL α , la incubación de las CDs con la elastasa aumentó (135%) la producción de TGF β . La capacidad de un inhibidor de proteasa fisiológico de revertir el efecto de la elastasa y de los SC de PMNL α fue evaluada luego de clonar y caracterizar el inhibidor secretorio de proteasa leucocitaria (ISPL) (resumen enviado SAI2003). La incubación del ISPL con los SC de PMNL α revirtió parcialmente la producción de TGF β y la proliferación de linfocitos T alogénicos (37 y 47% respectivamente). Lo mismo ocurrió cuando se incubó al SLPI con elastasa. El efecto de los SC de PMNL α sobre las CDs fue específico para CDs inmaduras, ya que no se observó en CDs tratadas con LPS; y es reversible ya que un anticuerpo CD40 activador disminuyó la producción de TGF β . Estos resultados sugieren que la elastasa es uno de los principales mediadores del efecto de los PMNLs sobre las CDs inmaduras, ejerciendo mecanismos fisiológicos de control de la respuesta inmune.

NEUROCIENCIAS IV

364. (3859) INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA CIRCADIANO Y EL SISTEMA INMUNE: ROL DE LA GLÍA DE LOS NÚCLEOS SUPRAQUIASMÁTICOS. LEONE, MARIA JULIANA; MARPEGAN, LUCIANO; BEKINSCHTEIN, TRISTAN; COSTAS, MONICA; GOLOMBEK, DIEGO A.

Laboratorio de Cronobiología. Universidad Nacional de Quilmes Laboratorio de Sustancias Vasoactivas. Instituto de Investigaciones Médicas "Dr. Alfredo Lanari".

En los mamíferos el reloj biológico está localizado en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), los cuales están enriquecidos en glial fibrillary acidic protein (GFAP) -marcador específico de astrocitos- con respecto a otras estructuras encefálicas. Además, existen evidencias de un cambio circadiano en la marcación de GFAP en los NSQ y de la participación de las células de glía de dichos núcleos en mecanismos de entrada y salida del reloj. En nuestro laboratorio se ha demostrado la presencia del factor de transcripción NF-kB, fundamental en el sistema inmune, en los NSQ. Todo esto, sumado a que las células de glía expresan y responden a citoquinas, sugiere que podrían funcionar como mediadoras de señales provenientes del sistema inmune al sistema circadiano. En particular, estudiamos los mecanismos existentes en la glía de los NSQ que involucran a NF-kB. La presencia de GFAP y de NF-kB fue demostrada por colocalización por inmunofluorescencia en cortes de cerebro conteniendo los NSQ y en cultivos primarios de glía de NSQ. En estos últimos también evidenciamos por inmunocitoquímica la presencia de receptores para Interleuquina-1 (IL-1) y Factor de Necrosis Tumoral (TNF). La capacidad de responder a estímulos inmunes fue evaluada por transfección de dichos cultivos con un vector conteniendo el gen de luciferasa bajo el control del promotor de NF-kB. La actividad transcripcional kB aumentó aproximadamente 3 veces con lipopolisacárido bacteriano (LPS) 2 µg/ml y TNF 20 ng/ml, y 1.7 veces con IL-1 100 ng/ml, con respecto al control, luego de 12 horas de estimulación. Estos resultados sugieren que las células de glía de los NSQ pueden mediar señales de entrada al sistema circadiano de ratón provenientes del sistema inmune.

365. (3865) FACTORES NEUROTROFICOS Y TRANSMISION NORADRENÉRICA. EFECTOS DE LA NT-4 Y EL NGF EN EL HIPOTÁLAMO DE RATA. RODRÍGUEZ FERMEPIN, MARTÍN; ROSON, MARÍA INÉS; FERNÁNDEZ, BELISARIO ENRIQUE

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Los factores neurotróficos (FN) y sus receptores están ampliamente distribuidos en el cerebro, regulando diferentes procesos como la liberación de neurotransmisores, la plasticidad sináptica y la supervivencia y diferenciación celular. Continuando el estudio de los efectos de los FN sobre la transmisión noradrenérgica, se investigaron las acciones de la Neurotrofina 4 (NT-4) y el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) sobre la captación, liberación basal y liberación estimulada (KCl 25 mM) de (3)H-Noradrenalina (NA) en hipotálamo de rata. Los experimentos se realizaron de acuerdo a modificaciones de las técnicas de Vatta y col (Reg. Pep. 65. 175, 1996). Los resultados (expresados como dpm/µg proteína \pm ESM) indican que la NT-4 disminuyó la captación (NT-4 vs Control: $3,11 \pm 0,16^*$ vs $3,80 \pm 0,08$; $n=8-9$; $*p < 0,05$) y la liberación estimulada de NA (NT-4 vs Control: $10,56 \pm 0,80^*$ vs $14,70 \pm 1,75$; $n=8-9$; $*p < 0,05$) y no alteró la liberación basal de la misma (NT-4 vs Control: $2,70 \pm 0,15$ vs $2,57 \pm 0,25$; $n=8-9$). Por otro lado, el NGF solo incrementó la liberación basal de la amina (NGF vs Control: $2,93 \pm 0,23^*$ vs $2,22 \pm 0,23$; $n=8-9$; $*p < 0,05$). La disminución de la liberación estimulada producida por la NT-4 no se observó en presencia de K252a (inhibidor de los receptores Trk) NT-4+K252a vs Control: $13,81 \pm 1,40$ vs $14,70 \pm 1,75$. Asimismo, el efecto del NGF sobre la liberación basal de NA tampoco se evidenció en presencia del K252a (NGF+K252a vs Control: $2,73 \pm 0,16$ vs $2,47 \pm 0,31$. $n=8-$

9). Los efectos opuestos de la NT-4y el NGF sobre la liberación de NA indican que las mencionadas neurotrofinas se comportan antagonicamente sobre la actividad simpática central. El diferente comportamiento de los FN sobre la transmisión simpática se puede atribuir ya sea a la especificidad del NT-4 sobre el receptor Trk B y del NGF sobre el Trk A o a las diferentes vías de señalización mediadas por los receptores Trk.

366. (3874) DIAGNÓSTICO Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER ESPORÁDICA(EAE): POLIMORFISMOS APOE Y ECNOSGLU298ASP. MUCHNIK, CAROLINA; DOS RAMOS FARIAS, MARIA; BRUSCO, IGNACIO; SANTORO, PATRICIA; MUCHNIK, SALOMÓN; ARRIZURIETA, ELVIRA; AZURMENDI, PABLO

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA

La EAE es la forma de demencia más frecuente en personas mayores de 60 años y su etiología es desconocida, así como su diagnóstico de certeza precoz. Existen factores genéticos de riesgo asociados a su desarrollo, como APOE, y otros como ecNOS que aún no muestran resultados definitivos. La influencia genética en la declinación cognitiva de la EAE ha sido estudiada sin llegarse a una conclusión. Por ello, analizamos la influencia de polimorfismos de APOE y ecNOS como factores de riesgo o de declinación cognitiva de la EAE en nuestra población. Estudiamos pacientes con diagnóstico de EAE según criterios NINCDS-ADRDA (n= 49) y controles >60 años (C>60) sin antecedentes neurológicos (n= 31). En un grupo de 19 pacientes EAE se correlacionaron resultados de mini mental score (MMSE) con el tiempo de evolución. Los polimorfismos APOE y ecNOSGlu298Asp se determinaron en con reacción en cadena de la polimerasa y digestión con enzimas de restricción. Las frecuencias en EAE de alelo 4 (0.33) así como de genotipos 3/4-4/4 (0.45) está aumentada respecto a C>60 (0.07 y 0.16, p<0.0001 respectivamente). La EAE está asociada con el alelo 4 [OR(IC 95%):7.0 (2.3 a 21.1)] y los genotipos 3/4-4/4 [9.7 (2.6 a 36.3)] con p<0.0001, respectivamente; con un likelihood ratio de 5.06 y especificidad del 89% (IC 95%: 74 a 97%) junto al diagnóstico clínico. El ecNOSGlu298Asp no muestra diferencia entre la poblaciones estudiadas. La caída de MMSE de EAE no muestra diferencias con APOE, mientras que en el ecNOSGlu298Asp los Glu/Glu y Glu/Asp muestran dos subpoblaciones con una progresión definida (9.9e0.06x,R=0.69 y 4.6e0.24x, R=0.80, p<0.05 respectivamente), aunque las pendientes no son estadísticamente distintas. La presencia del alelo 4 y/o genotipo 3/4 o 4/4 está asociado a un aumento de 5 veces el riesgo de padecer la EAE. El ecNOSGlu298Asp podría ser un indicador de la evolución de la función cognitiva, pero debería aumentarse el número de muestras.

367. (3909) RESPUESTA DEL CITOCROMO P450 Y DE LA MONOOXIGENASA CITOCROMO P450 REDUCTASA FRENTE A AGENTES PORFIRINOGÉNICOS EN CEREBRO. RELACIÓN CON LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO. LAVANDERA, JIMENA; BATLLE, ALCIRA; BUZALEH, ANA MARÍA

Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA-CIPYP, CONICET.

El citocromo P450 (CYP) juega probablemente un papel importante en la transformación de moléculas exógenas que atraviesan la barrera hematoencefálica en cerebro. El NO interacciona reversiblemente con el Fe del hemo del CYP, el rol patofisiológico de esta interacción no se conoce. Las porfirias agudas causan severas neuropatías. La patofisiología del ataque agudo estaría relacionado con i) limitada disponibilidad de hemo en el SNC, ii) efectos tóxicos de las porfirinas y/o precursores en el SNC o en nervios periféricos o iii) limitada disponibilidad de hemo como cofactor de la NO sintetasa. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la participación del CYP en la metabolización de drogas porfirinogénicas en cerebro de ratones. Se midió CYP total,

la actividad de la CYP reductasa y en forma indirecta los niveles de NO. Se observó un incremento del 150% en los niveles de CYP mitocondrial (VN 104,0±20,0 pmol/mg) en cerebro de animales que recibieron Griseofulvina en la dieta (178,2±46,2), pero hubo una disminución entre el 20-40% debido al ayuno (58,1±21,4), Isoflurano (73,2±14,6), allisopropilacetamida (78,6±21,3) y griseofulvina tópica (82,4±14,3). La actividad de la CYP reductasa se indujo 150% luego del tratamiento con griseofulvina, 40% por Enflurano e Isoflurano y 150% por ayuno. Los niveles de NO variaron dependiendo del agente porfirinogénico estudiado. Los resultados obtenidos, indicarían que algunos de estos agentes porfirinogénicos podrían ser metabolizados en cerebro y producirían alteraciones tanto en el sistema metabolizante de drogas de fase I como en el metabolismo del óxido nítrico. No obstante es necesario realizar un estudio más intensivo que identifique las diferentes isoformas del CYP involucradas en la metabolización de dichos agentes.

368. (3917) ESTRÉS OXIDATIVO PRODUCIDO POR AGENTES PORFIRINOGÉNICOS EN CEREBRO DE RATÓN. BUZALEH, ANA MARIA; RODRIGUEZ, JORGE; MARONI, LUCIANO; MARTINEZ, MARIA DEL CARMEN; GEREZ, ESTHER; BATLLE, ALCIRA

Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA-CIPYP-CONICET

El cerebro está más desprotegido que otros órganos frente a la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS), pues la actividad de las enzimas detoxificantes es baja. El ácido 5-aminolevulíco (ALA), responsable de la neuropatía de las porfirias hepáticas agudas, genera ROS que causan lesiones oxidativas en las membranas sinápticas de cerebro. La Hemo oxigenasa (HO), que degrada el hemo; se induce en respuesta al estrés. Hemos demostrado que el ALA produce en cerebro de ratón alteraciones del sistema colinérgico e inducción de la HO (SAIC 2002). El objetivo ha sido evaluar el estado de estrés oxidativo en cerebro de ratones tratados con diferentes agentes porfirinogénicos. Se midieron niveles de marcadores de estrés oxidativo, TBARS, glutatión (GSH), actividad de las enzimas involucradas en el sistema antioxidante y la HO a nivel bioquímico y molecular. Se observó aumento en la actividad de HO (VN. 3,553±0,799 U/mg) luego del tratamiento crónico con los anestésicos Enflurano (5,168±0,893) e Isoflurano (5,488±1,998), con Griseofulvina (Gris) en la dieta (6,171±1,769) y luego de 24 horas de ayuno (5,559±0,413). Los anestésicos produjeron aumento en la expresión del mRNA de HO. No se observaron variaciones en los niveles de GSH. La Gris y el Enflurano redujeron un 30% la actividad de GSH peroxidasa. (VN 22,39±4,35 U/mg). La Superóxido dismutasa (VN 764,22±239,55 U/mg) disminuyó 57% por administración aguda de los anestésicos. Se determinaron además las actividades de catalasa y GSH reductasa y los niveles de TBARS. Estos resultados indicarían que algunos agentes porfirinogénicos producirían un estado de estrés oxidativo en cerebro que contribuiría y podría ser uno de los factores conductores a la neuropatía porfírica. El aumento de HO implica el disparo de mecanismos antioxidantes.

369. (3919) MODIFICACIÓN DE LA REACTIVIDAD DOPAMINÉRGICA HIPOTALÁMICA POR ALLOPREGNANOLONA. LACONI*, MYRIAM; REGGIANI*, PAULA; CABRERA, RICARDO *Igual colaboración

LINCE-IMBECU-CONICET LINCE-IMBECU-CONICET

Las hormonas esteroideas y sus metabolitos sintetizadas de novo en el sistema nervioso son llamadas neuroesteroides. Allopregnanolona (ALL) es un neuroesteroide que modula la actividad de diferentes sistemas de neurotransmisión. Hemos demostrado previamente que tanto la progesterona como ALL pueden modular el sistema dopaminérgico en el cuerpo estriado de la rata dependiendo del estado hormonal ovárico. Objetivo: estudiar el efecto de ALL sobre la dinámica del sistema dopaminérgico mediante la medición de las concentraciones de DOPA,

DA y DOPAC en el hipotálamo medio basal (MBH). Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley bajo diferentes condiciones hormonales ováricas endógenas. Los grupos experimentales fueron: Ovariectomizadas (OVX), Ovariectomizadas impregnadas con estrógeno (25µg/rata) y progesterona (1mg/rata) (OVXep), Diestro (D1) y Estro (E). Los animales fueron inyectados intracerebroventricularmente con ALL (6.2µM) o vehículo (KRBG). Las concentraciones de DA, DOPA y DOPAC se determinaron por HPLC y se expresaron en ng/mg de proteínas. Posteriormente se calcularon los índices de síntesis (DA/DOPA) y de recambio (DOPAC/DA). Los resultados (media±ES) se analizaron estadísticamente con el test-t no pareado. Observamos que en los grupos OVX y D1, ALL no modificó los índices mencionados. En el grupo OVXep ALL redujo el índice de recambio respecto del vehículo (1.12±0.33 vs 0.28±0.06; P<0.01), sin modificar el índice de síntesis. En el grupo E, ALL disminuyó el índice de recambio respecto del vehículo (0.63±0.11 vs 0.22±0.05; P<0.01) incrementando el índice de síntesis respecto del vehículo (0.40±0.06 vs 1.7±0.48; P<0.05). Allopregnanolona tiene un efecto inhibitorio no-genómico sobre la dinámica dopaminérgica en el HMB dependiente de la acción genómica de los esteroides ováricos endógenos. Esta inhibición induciría cambios en el tono dopaminérgico hipotalámico que regula funciones endocrinas asociadas al eje gonadal femenino.

370. (3926) ACCIÓN MODULATORIA DE ALLOPREGNANOLONA SOBRE RECEPTORES GABA EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE LH. CABRERA, RICARDO; FARRÉ, EUGENIA; BAZAN, ELIANA; GOZÁLEZ, JORGE

LINCE-IMBECU-CONICET LINCE-IMBECU-CONICET

Los neuroesteroides son moléculas moduladoras de receptores ligados a canales iónicos como GABA A y NMDA. En estudios previos demostramos que la administración intracerebroventricular (icv) de Allopregnanolona (ALL) inhibe la ovulación y la conducta sexual en la rata hembra. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción de ALL (icv) sobre la reactividad del sistema GABAérgico que controla la liberación de LH. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas (OVX) impregnadas con estrógeno (25µg/rata sc) y progesterona (1mg/rata) (n=8-10/grupo). En el día del experimento se les colocó un catéter en la vena yugular para extracción seriada de sangre. A las 16 hs. se tomó una muestra basal y posteriormente se le administró icv ALL 120 nM o KRBG como control. Se colectó sangre cada una hora desde las 17 hs. hasta las 21 hs. inclusive. En otros grupos independientes se administró el antagonista GABA A, Bicuculina (Bic) en dosis 2.45 µM, 4.9 µM o 9.8 µM, solo o combinado con ALL. Los resultados se expresaron como la media + SEM en ng/ml y analizados estadísticamente punto a punto usando test-t. ALL indujo una inhibición de la descarga de LH respecto del grupo control a las 18, 19 y 20 hs. (10.4+ 2.9vs.4.5+1.5; 14.7+4.0vs.5.5+3; 15.8+3.1vs.6.1+2.2) (P<0.01; P<0.001; P<0.001 respectivamente). Bic revirtió el efecto inhibitorio de ALL a la dosis 4.9 µM a las 20 hs. (17.5+ 2.1vs.6.1+2.2) (P<0.05), sin tener efecto per se sobre la liberación de LH. Bic 9.8 µM también revirtió el efecto de ALL a las 19.20 hs. (P<0.01 respectivamente), pero presentó un claro efecto per se. Concluimos que ALL tiene un potente efecto inhibitorio central no genómico sobre la liberación de LH hipofisaria, modulando la actividad del sistema GABAérgico a través del su receptor GABAA .

371. (3957) LA ELECTORRETINOGRAFÍA COMO MÉTODO DE ANÁLISIS PREQUIRÚRGICO PARA LA CIRUGÍA DE CATARATAS EN CANINOS. SANDE, PABLO

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental Dpto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, U.B.A.

Algunas razas caninas, (particularmente Cocker, Caniche y Fox terrier) presentan una alta incidencia de patologías visuales hereditarias, en especial degeneraciones retinianas (DHR) y cataratas. La electrorretinografía (ERG) es una herramienta de diag-

nóstico de amplio uso en humanos para evaluar el funcionamiento retiniano y podría contribuir a pronosticar el éxito de la cirugía de cataratas en cuanto a la recuperación de la visión. El objetivo del presente trabajo fue analizar mediante ERG, el estado funcional de las retinas de caninos con cataratas. Para ello, se examinaron 115 perros con cataratas bilaterales (35 Cockers, 30 Caniches, 13 Fox terriers y 37 perros de varias razas), sin alteración unilateral de los reflejos pupilares u otra alteración del globo ocular (se descartaron los ojos con uveitis y/o glaucoma). Los animales se clasificaron en tres grupos etarios: jóvenes (hasta 5 años), adultos (de 6 a 9 años) y gerontes (más de 9 años). Asimismo, los ERGs se dividieron en tres grupos: normales, subnormales y nullos, considerando éstos dos últimos como patológicos. Las alteraciones unilaterales se analizaron por ecografía, y los animales con desprendimiento de retina se eliminaron del estudio. De los 115 caninos analizados, 46 presentaron un ERG patológico. En la clasificación por razas, el 65% de Cockers, el 47% de Caniches, el 15% de Fox terriers y el 19% de otras razas presentaron un ERG patológico. En el análisis por edad, 22% de jóvenes, 56% de adultos y 35% de gerontes mostraron un ERG patológico. Estos resultados confirman una alta incidencia de DHR en Cockers y Caniches, que se manifiesta en mayor proporción en adultos. Asimismo, estos resultados avalan el uso del ERG como método para el análisis prequirúrgico en la cirugía de cataratas.

372. (3975) RELACIONES ENTRE PREFERENCIAS CORPORALES Y ASIMETRÍAS DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA CEREBRAL. PEREZ LEGUIZAMON, P; FASSA, D; URBAN, F; DUTTO, D; FRIONE, YORIO, A; SEGURA, E

Lab. Biol. Comport. (IBYME-CONICET).

En el presente trabajo se estudia en 32 voluntarios sanos (edades 25-40 a.) la relación entre dominancia ocular-manual y asimetrías de la actividad electroencefalográfica (EEG) espontánea y provocada. La dominancia manual-ocular se estableció por evaluación conductual. En cada sujeto se efectuaron registros EEG en 5 condiciones al azar: ojos cerrados, estimulación en hemisferios derecho e izquierdo, en ojos derecho e izquierdo. La preferencia manual fue de 28 sujetos diestros, 2 zurdos y 2 ambidextros. Las relaciones entre la preferencia manual y la preferencia ocular fueron: diestro-ojo derecho 59.37%; diestro-ojo izquierdo 28.15%; zurdo-ojo derecho 3.12%; zurdo-ojo izquierdo 3.12%; ambidextro-ojo derecho 6.25%. La estimulación visual en todas las condiciones se asoció a disminución sostenida de la amplitud EEG (alrededor del 50%), sólo en el hemisferio izquierdo (condiciones F=5.20, P=0.001; hemisferio F=4.49, P=0.046; condiciones X hemisferio F=3.60, P=0.009). La actividad EEG espontánea y provocada por estimulación mostró diferencias significativas entre sujetos de dominancia directa y cruzada en varias de las condiciones de registro. Se concluye: 1) Aunque existe cierta correspondencia entre la dominancia manual y ocular, una elevada proporción de sujetos normales exhibe dominancia cruzada ojo-mano. 2) Según las hemiretinas estimuladas se inducen sincronización y desincronización EEG con diferenciación hemisférica. 3) Los sujetos de dominancia cruzada difieren de los de dominancia directa en las asimetrías EEG espontáneas y provocadas. Estos hallazgos sugieren que las diferencias de actividad EEG podrían estar relacionadas con diferencias hemisféricas en la organización cerebral.

373. (3983) EFECTO DE LA RADIACION GAMMA EN CEREBRO DE RATAS WISTAR: EVALUACIÓN DEL STRESS OXIDATIVO DEPENDIENDO DEL GRUPO ETARIO. PEREZ DE LA HOZ, ALEJANDRO; RIGANO, LUCIANO; EVELSON, PABLO; TASAT, DEBORAH

Universidad Nacional de San Martín Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

La terapia radiante es utilizada en el tratamiento de tumores primarios del sistema nervioso que es susceptible al daño

oxidativo. Sin embargo, esta terapéutica está limitada a la resistencia del tejido. En este trabajo investigamos si el grado de estrés oxidativo en distintos grupos etarios estaría asociada a esta radioresistencia. Para ello evaluamos la ocurrencia de estrés oxidativo en cerebros normales de rata Wistar macho expuestos a radiación gamma. Ratas jóvenes (J, 1-2 meses), adultas (A, 8-9 meses) y senescentes (S, 12-15 meses) fueron irradiadas con dosis de 40 Gy (n=16 por grupo). Se analizó en homogeneizado de cerebro 24 horas post-irradiación, la ocurrencia de estrés oxidativo mediante quimioluminiscencia espontánea (QL), daño oxidativo a lípidos evaluando el nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la capacidad antioxidante total del tejido (TRAP). Los valores de QL fueron mayores en todos los grupos respecto de los controles (Co). El valor de QL en J fue menor respecto de los otros dos grupos (aumentos del 5% para J, 36% para A y 20% para S). El análisis por TBARS mostró resultados comparables a QL (disminución del 25% para J y aumentos del 53% y 83% para A y S). Mientras que los niveles de antioxidantes en J y A fueron superiores a los de S (aumento del 8% para J y disminución del 15% para A y 54% para S) El grupo S es el grupo que muestra mayor estrés oxidativo (aumento de QL y TBARS y disminución de antioxidantes) respecto al Co. En cambio el grupo A muestra respuesta adaptativa ya que los niveles de QL y TBARS son semejantes al del grupo S pero presenta mayor capacidad antioxidante total. En el grupo J los niveles de TRAP fueron semejantes a los de A sin diferencias significativas en la QL y TBARS. En conclusión la ocurrencia de estrés oxidativo podría estar asociada al incremento en la susceptibilidad de estos animales a esta terapia, un hecho que refleja la respuesta diferencial a la radiación observada en la clínica

374. (4011) PARAMETROS CONDUCTUALES AFECTADOS EN RATONES DIABÉTICOS POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ). REVSIN, YANINA; ALVAREZ-TORO, EDGARDO; SARAVIA, FLAVIA; BAZAN, ARTURO; DE NICOLA, ALEJANDRO

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Dpto Bioquímica Fac de Medicina UBA, Fac Cs Médicas Univ Nac de Cuyo, Mendoza.

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica cuya incidencia mundial crece aun más en los próximos años. Se acompaña de varias consecuencias secundarias bien estudiadas y varias de ellas afectan al sistema nervioso central. Trabajando con el modelo farmacológico de diabetes tipo I de inducción por STZ (180 mg/kg i.p.) en ratones C57BL/6 observamos anomalías gliales y neuronales del hipocampo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si estas alteraciones bioquímicas en los animales diabéticos (Db) se correlacionaban con cambios conductuales. Se estudió la motivación exploratoria en un laberinto en cruz elevado asimétrico que tiene 4 brazos con diferentes ambientes conflictivos. Los resultados mostraron que la exploración del grupo Db fue significativamente menor en uno de esos brazos, comparado con los controles (Ctl) (Brazo Alto Bajo, 86±7 seg vs 121.4±11.2 seg, p< 0.01; Db vs Ctl, n=8-13). Cuando se estudió la exploración en ambientes no conflictivos (OVM), se observó en el grupo Db una performance menor tanto en actividad horizontal, ambulatoria como no ambulatoria (Act Horz: 2166±310 vs 4288±855 cuentas/5 min, p< 0.01, Db vs Ctl; Act Amb: 1222±315.9 vs 2922±565 cuentas/5 min, p< 0.01, Db vs Ctl, n=4-13). En el test de aprendizaje y memoria de una respuesta de evitación condicionada, los Db mostraron solo una disminución aparente de la latencia de escape. En un trabajo previo, observamos en los animales diabéticos una disminución muy significativa de la capacidad neurogénica hipocampal y otros autores asocian la neurogénesis con ciertos tipos de aprendizaje y condicionamiento al miedo. Nuestros resultados sugieren que la enfermedad afecta diferentes parámetros conductuales emocionales asociados al hipocampo ventral, que se correlacionan con perturbaciones neuroquímicas en esta estructura en el modelo estudiado.

NEFROLOGÍA III

375. (3637) ELIMINACIÓN RENAL DE PARAAMINOHIPURATO EN RATAS CON COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA DE 72 H DE DURACIÓN. ROL DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA OAT1. BRANDONI, ANABEL; VILLAR, SILVINA R.; TORRES, ADRIANA M.

Area Farmacología. Fac. de Cs. Bioq. y Farm. UNR. CONICET

Estudios previos han demostrado alteraciones en la farmacocinética de paraaminohipurato (PAH) en ratas con colestasis extrahepática de 72 h de duración. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el manejo renal de PAH en ratas Wistar macho adultas con ligadura del conducto biliar de 72 h (L, n=8). También se procesó un grupo de ratas Sham (S, n=7). Se evaluó la cantidad de PAH excretado en orina (Q[PAH], mg) y se calculó la depuración renal de PAH (Cl_rPAH, mL/min/100g p.c.) a partir de datos obtenidos en el estudio de la farmacocinética de este anión, luego de administrar una dosis única del mismo (30 mg/kg p.c., iv.). Se determinó la abundancia de la proteína transportadora de aniones orgánicos, OAT1, mediante Western Blot, en homogenatos de corteza renal (OAT1H, %) y en membranas basolaterales de células tubulares proximales de riñón (OAT1M, %). Resultados: Q[PAH]: S= 4.74 ± 0.48, L= 2.79 ± 0.72*; Cl_rPAH: S= 5.41 ± 0.51, L= 2.49 ± 0.74*; OAT1H: S= 100 ± 5, L= 99 ± 7; OAT1M: S= 100 ± 6, L= 71 ± 9* (*P<0.05). Conclusión: En estudios anteriores demostramos una disminución en la depuración sistémica de PAH en ratas con colestasis extrahepática de 72 h. En este trabajo se observó una disminución en la cantidad de PAH excretada en orina y en la depuración renal del anión. Esto se podría explicar por la disminución observada en la abundancia de OAT1 en membranas basolaterales de células tubulares proximales de riñón, que podría deberse a una redistribución de la proteína transportadora.

376. (3720) DETECCIÓN DE VARIANTES DEL GEN SAA EN CEPAS DE ESCHERICHIA COLI VEROCITOTOXIGÉNICA. LUCCHESI, PAULA M. A.; KRÜGER, ALEJANDRA; SANZ, MARCELO E.; PADOLA, NORA LÍA; PARMA, ALBERTO E.

Lab. Inmunoquímica y Biotecnología - Fac. Cs. Veterinarias - UNCPBA

Escherichia coli verocitotoxigénica (VTEC) puede producir severas enfermedades en humanos como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. El bovino es reservorio de VTEC, por esto el estudio de cepas aisladas a partir de bovinos y de alimentos cárneos es importante epidemiológicamente. La patogénesis de la infección por VTEC no está completamente comprendida, se considera multifactorial y dependiente de varios factores bacterianos y del huésped. Entre los factores bacterianos están la producción de verocitotoxinas y la proteína de adhesión íntima, y también la presencia de un megaplásmido portador de otros posibles factores de virulencia. Recientemente, en cepas carentes de íntima (VTEC eae-), se describió una adhesina (Saa) que posee diferencias en adhesión vinculadas a distintos tamaños moleculares. En este estudio nos propusimos determinar la presencia del gen saa y sus posibles variantes en cepas VTEC aisladas en Argentina. Para su detección utilizamos la técnica de PCR con "primers" específicos de saa, y para sus variantes diseñamos otro par de "primers" que amplifican la región repetitiva responsable de los diferentes tamaños. De un total de 117 VTEC eae-, detectamos 36 (30,8%) cepas saa+, 10 de alimentos cárneos y 26 de bovinos. Encontramos 4 variantes de este gen en las cepas aisladas de bovinos, y sólo 2 de éstas en las cepas de alimentos. La técnica desarrollada fue exitosa para diferenciar con claridad y rapidez las variantes del gen saa. El hallazgo del gen saa y de sus variantes en las cepas de nuestro país amplía el número de marcadores epidemiológicos necesarios para correlacionar estos aislamientos con aquellos correspondientes a casos clínicos pediátricos y representa una advertencia sobre la potencial virulencia de VTEC eae-.

377. (3820) FUNCIONES RENALES DURANTE LA FASE INICIAL DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA EN RATAS. MAHIEU, STELLA TERESITA; MILLEN, NÉSTOR; GONZALEZ, MARCELA A; ELÍAS, MARÍA MÓNICA

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

El hígado constituye un sitio sensor para la homeostasis de la volemia. El daño hepático puede influenciar la función renal, poco se ha reportado sobre los procesos regenerativos hepáticos y su influencia sobre el riñón. El objetivo de este trabajo fue examinar las funciones renales en un modelo de hepatectomía parcial (65%, HP). Se trabajó a los 2 (HP2, n=7) y 4 días (HP4, n=8) post HP. Se utilizaron controles apropiados (C, n=11). Se efectuaron balances de agua y sodio, se estudiaron parámetros hemodinámicos y tubulares, y la evolución de la función hepática a partir de LDH y ALT. En el período estudiado, no se observaron cambios en el peso corporal. Los datos indicaron: VFG (ml/min/100g): C, 0.81±0.02, HP2, 0.70±0.02*, HP4, 0.67±0.05*, p<0.05; flujo plasmático renal (ml/min/100g): C, 3.15±0.2, HP2 2.72±0.15, HP4 3.25±0.25; fracción de filtración: C, 0.29±0.01; HP2 0.26±0.01*, HP4 0.19±0.01*, p<0.05. Los parámetros tubulares en HP2 indican aumento de la excreción de agua y sodio, sin cambios en la osmolalidad; en HP4 se mantiene alta la excreción de agua con retención de sodio junto con aumento de aldosterona sérica (pg/ml): C, 330±40, HP2, 341±74, HP4, 660±96). Ninguno de los grupos tratados presentó cambios en Na, K, y creatinina en suero. La función hepática coincidió con aumento sostenido en LDH y ALT con tendencia a disminuir en HP4. La urea disminuye en HP2, tal vez asociado a la menor actividad metabólica hepática. Estos datos nos permiten concluir que el proceso de regeneración hepática también involucra a la función renal.

378. (3832) FUNCIONES RENALES DURANTE LA FASE INICIAL DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA EN RATAS. EFECTOS DE UNA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON ALUMINIO (AL). MAHIEU, STELLA TERESITA; GONZALEZ, MARCELA A.; MILLEN, NESTOR; ELÍAS, MARÍA MÓNICA

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR

Reportamos que durante el proceso de regeneración hepática después de una hepatectomía parcial (HP, 65%) el riñón de rata presenta modificaciones funcionales significativas a los 4 días. Fue de interés verificar si ese proceso se mantenía en animales con intoxicación crónica con lactato de Al que afecta tanto a la función renal como a la hepática. Se trabajó con cuatro grupos experimentales: Controles (C, n=11), Al (n=8) (tratadas durante tres meses por v.ip 0.5mg/100g, 3 veces por semana); HP (n=8) y Al+HP (n=7). Se efectuaron balances de agua y sodio, se estudiaron parámetros hemodinámicos y tubulares, y la evolución de la función hepática a partir de LDH y ALT. En el período estudiado, no se observaron cambios en el peso corporal de los animales. El Al no modificó los parámetros hemodinámicos renales, ni la actividad de enzimas hepáticas, mientras la hepatectomía redujo significativamente la VFG y la fracción de filtración (FF), sin cambios en el flujo plasmático renal (FPR) con aumento sérico de las enzimas mencionadas. La toxicidad por Al provocó los siguientes cambios: VFG (ml/min/100g): C, 0.81 ±0.02; Al, 0.82±0.05; HP, 0.67±0.05*; Al+HP, 0.48±0.04*, *p<0.05; FPR (ml/min/100g): C, 3.15±0.2, Al, 3.1±0.2, HP, 3.25±0.25; Al+HP, 2.40±0.1*, *p<0.05; FF: C, 0.29±0.01; Al 0.29±0.01, HP 0.19±0.01*, Al+HP 0.20±0.01*, *p<0.05. HP y Al+HP aumentan la excreción fraccional de agua similarmente sin cambios en la excreción fraccional de sodio en HP, con disminución en Al+HP a pesar que ambos grupos mostraron igual incremento en la aldosterona sérica (pg/ml): HP: 660±95, Al+HP: 568±72). Estos datos indican que Al (que afecta la regeneración hepática) condiciona también las respuestas que esta regeneración promueve en riñón.

379. (3912) CORRELACIÓN ENTRE DAÑO OCULAR Y RENAL POR DEFICIENCIA NUTRICIONAL DE COLINA. OSSANI, GEORGINA; FARIÑA, SILVIA; LAGO, NESTOR; PELAYES, DAVID; DÍAZ, MARISA; MONSERRAT, ALBERTO; ZÁRATE, JORGE

Patología Experimental, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA II Cátedra de Oftalmología, Facultad de Medicina, UBA y Medicina Nuclear, Hospital Británico

La deficiencia de colina produce daño a nivel de riñón, hígado, corazón, ojos y SNC. El objetivo fue estudiar el efecto en ojos de la alimentación de ratas macho recién destetadas con dieta deficiente en colina (CD), en relación con la patología renal. Cuarenta y nueve ratas Wistar, macho, recién destetadas fueron divididas en 2 grupos; 37 de ellas fueron alimentadas con dieta CD y las 12 restantes con dieta suplementada (CS) como control. Fueron sacrificadas entre los días 5 y 8 de iniciada la dieta, tomando como día 0 al del destete. Se realizó fondo de ojo, describiéndose lesiones hemorrágicas puntiformes, hipema o hemoviteo. Se separaron 38 ojos, correspondientes a 19 ratas, para estudio con microscopía óptica (MO) y 16 ojos, correspondientes a 8 ratas, para estudio con microscopía óptica de alta resolución (MOAR), incluyendo en ambos casos el estudio de la retina en forma plana. Ambos riñones fueron estudiados con MO. Se obtuvo sangre para dosaje de urea, creatinina y homocisteína. El daño ocular siempre se observó en ratas con necrosis renal. Tres ratas presentaron daño renal, sin lesión ocular. Las ratas CD sin necrosis renal no mostraron lesión ocular. Las ratas CS no mostraron lesión renal ni ocular. Los riñones mostraron necrosis tubular masiva con o sin necrosis cortical focal. Las lesiones oculares más frecuentes fueron: hemorragia en cámara anterior, cuerpo ciliar, cámara posterior y cuerpo vitreo. La lesión hemorrágica ocular es debida a alteraciones de la circulación hialoidea y retiniana. La deficiencia de colina produce a nivel ocular lesiones hemorrágicas que tienen una muy buena correlación con el fondo de ojo. La ausencia de lesión ocular en ratas con lesión renal, sustenta que la lesión renal precede a la ocular.

380. (4026) RELACION FACTOR NATRIURÉTICO ATRIAL-DOPAMINA RENAL. EFECTOS SOBRE LA PKG Y LA ACTIVIDAD DE LA MAO, LA COMT Y LA NA+, K+ ATPASA RENAL. CORREA, ALICIA; CHOI, MARCELO R.; VALERA, MARIA SOLEDAD; GIRONACCI, MARIELA; PEÑA, CLARA; FERNANDEZ, BELISARIO

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA Cátedra de Química Biológica I, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIFIB-CONICET

En trabajos anteriores observamos que el factor natriurético atrial (ANF) incrementa la captación de 3H-Dopamina (DA) en cortes de corteza renal externa de ratas Sprague Dawley incubados in vitro, a través del receptor NPR-A (inhibido por Anantin 100 nM). El análogo 8Br-GMPc 125 µM reprodujo sus efectos, los que fueron inhibidos por el azul de metileno 10 µM (inhibidor de la guanilato ciclasa). El ODQ 10 µM (inhibidor de la guanilato ciclasa soluble) careció de efectos, por lo que se descartó la participación del NO. Se continuaron los trabajos para estudiar la proteína quinasa involucrada y los efectos sobre la Na+, K+ ATPasa renal y las enzimas catabólicas MAO y COMT. El KT 5823 1µM (inhibidor de PKG) revirtió los efectos del ANF 100 nM sobre la captación renal de DA (dpm/g.105±ESM; n=4-8): Control (C): 6.42±0.09; ANF: 7.52±0.06 p<0.001 vs control; KT+ANF: 6.31±0.17. En presencia del inhibidor de la síntesis de DA, carbidopa 100 µM, el ANF 100 nM disminuyó la actividad de la Na+, K+ ATPasa (µmoles/mg prot/min±ESM, n=4-8): C: 0.35±0.02; carbidopa: 0.57±0.06 p<0.01 vs control; DA 1µM+carbidopa: 0.50±0.01 p<0.05 vs control; DA+ANF+carbidopa: 0.10±0.03 p<0.001 vs DA+carbidopa. El ANF disminuyó la actividad de la MAO (µmoles/mg prot/h±ESM; n=4-6) C: 144.6±3.2; ANF 117.8±6.6 p<0.05 y de la COMT (pmoles/mg prot/min; n=5-8) C:

0.32±0.014; ANF: 0.19±0.02 p<0.001. Estadísticas: ANOVA-Tukey Kramer, Student t-test Los resultados muestran que la PKG media los efectos renales del ANF y que parte de sus efectos natriuréticos indirectos se median a través del incremento de la DA renal inhibiendo la Na⁺, K⁺ ATPasa.

381. (4039) LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 DISMINUYE LA VIABILIDAD, INHIBE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS Y ESTIMULA LA APOPTOSIS DE CÉLULAS TUBULARES DE CORTEZA RENAL HUMANA. PISTONE CREYDT, VIRGINIA¹; NUÑEZ, PABLO¹; BIBINI, MARIEL²; DEL SORDO, MARTIN³; IBARRA, CRISTINA¹

¹Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA. ²Centro Nac.de Referencia para SIDA, Fac. de Medicina, UBA. ³Unidad de Urología,Hospital de Clínicas

La toxina Shiga tipo 2 (Stx2) producida por E.coli enterohemorrágica (EHEC) produce una variedad de síntomas clínicos caracterizada por diarrea acuosa, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). El objetivo del trabajo fue caracterizar los efectos de la subunidad B de Stx2 (Stx2B) purificada por cromatografía de afinidad, en cultivos primarios de células corticales de riñón humano (CERH). Las células se extrajeron de corteza renal humana proveniente de nefrectomías realizadas en pacientes adultos en el Hospital de Clínicas y se cultivaron hasta confluencia. Luego se incubaron en arresto de crecimiento durante 24, 48 y 72 hs con distintas dosis de Stx2B. La viabilidad celular se cuantificó en presencia y ausencia de factores inflamatorios mediante la incorporación de rojo neutro. La síntesis de proteínas se midió por incorporación de metionina marcada radioactivamente y la estimulación de apoptosis celular por fragmentación de ADN y citometría de flujo. Los resultados demuestran que CERH incubadas 72 hs con Stx2B (1 ng/ml) disminuye significativamente la viabilidad celular e inhibe la síntesis de proteínas. La disminución de la viabilidad celular se potenció cuando las células se preincubaron 24 hs con LPS (1mg/ml), IL-1β (0,1ng/ml) y butirato (2mM). Stx2B a concentraciones de 1 µg/ml estimuló la apoptosis celular. Los efectos observados fueron dosis y tiempo dependiente y de 2 a 3 órdenes de magnitud menores a los observados en presencia de Stx2 en todas las variables estudiadas. Estos resultados permiten clarificar la acción de la subunidad B de Stx2 en los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan la insuficiencia renal aguda en pacientes con SUH.

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ORAL

ONCOLOGIA IV

382. (3634) LA INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS TUMORAL POR FRAGMENTOS DE ACIDO HIALURÓNICO (AH) ES INDEPENDIENTE DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NFKB. ALANIZ*, LAURA; GARCÍA, MARIANA; BLANCO, GUILLERMO; DIEZ, FEDERICO; ALVAREZ, ELIDA; HAJOS, SILVIA E**

Cátedra de Inmunología, FFyB, UBA. Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IDEHU-CONICET *Becaria CEDIQUIFA,**

Componentes de la matriz extracelular (MEC) pueden modular el comportamiento tumoral. Entre éstos AH al interactuar con CD44 influiría sobre la migración, sobrevida y proliferación, efectos que estarían en relación con su PM. AH expresado en la MEC que rodea a ciertos tumores mantendría activado a NFKB afectando la sobrevida tumoral. Estudios previos en las líneas tumorales murinas LBLa y LBLc evidenciaron la capacidad de AH de regular la migración celular y activación de metaloproteinasas. Se realizaron ensayos de EMSA para evaluar los efectos de AH sobre la activación de NFKB, además se usó su inhibidor especí-

fico BAY11-7082 y Wartmanina como inhibidor de PI3K, proteína capaz de inducir señales anti-apoptóticas. Se halló actividad basal en extractos nucleares de LBLa y LBLc que fue inhibida por BAY pero no por Wartmanina. El tratamiento con AH de alto PM (APM) aumentó la señal en ambas líneas, efecto mediado por CD44 ya que fue bloqueado por el AcMo IM7; AH de bajo PM (BPM) no modificó la actividad. Sin embargo el tratamiento conjunto de AH-APM con hialuronidasa (Hasa) disminuyó la actividad al basal, aunque no produjo inhibición total. Por microscopia de fluorescencia y fragmentación del ADN, se analizó la apoptosis en condiciones similares a las usadas para EMSA. Bay o Wartmanina indujeron apoptosis; si bien AH-APM o BPM no afectaron significativamente la sobrevida el tratamiento con Hasa junto a uno u otro tipo de AH indujo apoptosis de 23±2 y 19±3% respectivamente. Los productos de degradación de AH obtenidos con Hasa no inhibieron la actividad basal de NFKB pero favorecieron la muerte celular. Si bien AH nativo no afectó los niveles de apoptosis, si lo hicieron fragmentos derivados del mismo a través de un mecanismo independiente de la activación de NFKB.

383. (3640) ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NFKB Y SU MODULACION EN CELULAS RESISTENTES A DOXORUBICINA Y VINCISTINA. GARCIA, MARIANA; ALANIZ, LAURA; CALDAS LOPES, ELOISI; BLANCO, GUILLERMO; CAPULA, MARINA; ALVAREZ, ELIDA; HAJOS, SILVIA

Cátedra de Inmunología- Facultad de Farmacia y Bioquímica

La resistencia a multidroga es una de las principales causas del fracaso de la terapia antitumoral. Sus mecanismos son variados y operan a diferentes niveles que pueden ser desde disminución celular de la droga hasta inhibición de la apoptosis. NFKB está involucrado en la sobrevida celular y en la oncogénesis y aún no se esclareció el rol de la activación de NFKB por exposición a drogas. Parecería que su activación protege a las células de la apoptosis. Su inhibición las sensibilizaría al tratamiento aunque ciertos autores demostraron que ésta no aumenta el efecto citotóxico de las drogas. El objetivo de este trabajo fue analizar la relación entre NFKB y el fenotipo de resistencia, así como su posible modulación. Se utilizaron líneas celulares resistentes a vincristina (VCR) LBR-V y a doxorubicina (DOX) LBR-D y sensible LBR-, obtenidas previamente en nuestro laboratorio. Al analizar los niveles de NFKB por EMSA en extractos nucleares se observó que LBR-V y LBR-D presentaron una actividad mayor que LBR-, que fue disminuida por el inhibidor específico BAY 11-7082. El tratamiento con VCR o DOX produjo la activación de NFKB. Debido a que éste transcribe genes anti-apoptóticos, se evaluó la apoptosis en condiciones similares al EMSA por microscopia de fluorescencia y fragmentación del DNA, observándose que sólo BAY indujo apoptosis en LBR-V (33.5±6.4%) y LBR-D (44.2±5.1%). En LBR- tanto BAY (35.1±11.1%) como VCR (27.5±0.5%) y DOX (29.9±4.2%) tuvieron el mismo efecto. El tratamiento con el inhibidor junto a VCR y DOX no mejoró la apoptosis. Se concluye que las células resistentes presentan un mayor nivel de NFKB que estaría relacionado con el fenotipo de resistencia, permitiendo utilizar el inhibidor de NFKB para eliminar dichas células. En LBR-, BAY no mejoró la apoptosis inducida por VCR o DOX.

384. (3922) EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE NFKB EN UN LINFOMA MURINO: REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO POR BAY 11-7082 MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS. GRECZANIK, SOFÍA; GARCÍA, MARIANA; ALANIZ, LAURA; CAVALIERE, VICTORIA; LUZZI, RENATA; HAJOS, SILVIA; ALVAREZ, ELIDA

Cátedra de Inmunología- IDEHU. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

El linfoma LB es un desorden linfoproliferativo T murino que se caracteriza por su alto grado de invasividad y su incapacidad

de inducir una respuesta inmune efectiva. La expresión constitutiva de mensajeros para citoquinas y especialmente la expresión de la molécula CD25 nos llevaron a analizar la activación del factor NFκB, su modulación por inhibidores selectivos y sus efectos sobre la apoptosis celular. La activación del factor NFκB se estudio por ensayos de EMSA y supershift en el tumor primario y la línea derivada LB02, demostrándose una expresión activa a nivel nuclear del mismo constituida por las proteínas p50 y p65. La activación fue completamente inhibida por tratamiento durante 1h con BAY 11-7082 10 μM y parcialmente por CAPE. Cuando se analizó el efecto de AZT, éste fue activo a altas concentraciones (100-200μM) únicamente sobre la línea LB02. El tratamiento de LB02 con BAY 11-7082 10 μM produjo a las 24hs, una inhibición de la capacidad proliferativa del $64.0 \pm 28.1\%$ con respecto de las células no tratadas ($p < 0.05$), medido por incorporación de timidina tritiada. Cuando se correlacionó este efecto con la inducción de apoptosis, se encontró que la droga fue capaz de producir dicho efecto a partir de las 6 hs (% de apoptosis 55.5 ± 12.8 vs 7.2 ± 1.8 del control $p < 0.01$) con un máximo de acción a las 24hs (% de apoptosis 70.1 ± 0.8 vs 5.8 ± 0.8 del control $p < 0.001$). El tratamiento de las células con AZT (100-200μM) sólo o en combinación con IFN alfa no produjo resultados significativos. Concluimos que en el tumor LB y líneas derivadas existe una activación constitutiva del factor de transcripción NFκB (heterodímero p50/p65), el sería responsable de la sobrevida celular. El tratamiento con el inhibidor específico de la kinasa de IκB (BAY 11-7082) es capaz de anular completamente dicha activación, produciendo una disminución de la capacidad proliferativa de las células e induciendo la apoptosis celular.

385. (3998) ENSAYO CLÍNICO DE FASE I DE VACCIMEL Y GM-CSF EN PACIENTES CON MELANOMA ESTADIOS IIB, III Y IV. MORDOH, JOSE; BARRIO, MARCELA; BOVER, LAURA; MOTTA, PATRICIA; KAPLAN, JULIO; BRAVO, INES

Instituto Alexander Fleming, Centro de Investigaciones Oncológicas CIO-FUCA

VACCIMEL es una mezcla de tres líneas celulares allogeneicas de melanoma humano irradiadas. Un ensayo previo no randomizado de Fase II ha demostrado que VACCIMEL incrementa la sobrevida libre de enfermedad de pacientes con melanoma estadio III (AJCC) de 7.0 meses en el grupo control (n=24) a 20 meses en el grupo vacunado (n=30). En dicho ensayo solo hemos observado respuestas completas en aquellos pacientes que presentaban lesiones metastásicas pequeñas. Con la intención de incrementar la respuesta inmune de los pacientes vacunados, hemos iniciado un Ensayo de Fase I de VACCIMEL y GM-CSF (Disp ANMAT N° 4485/02) en pacientes con melanoma de estadios IIB, III y IV con enfermedad mínima residual (rango de edades: 15-68 años). Se administraron cuatro dosis de VACCIMEL i.d. (15 x 10⁶ células irradiadas por dosis), cada tres semanas, con BCG como adyuvante. Se formaron cohortes de cuatro pacientes que recibieron placebo, 150 μg o 300 μg de GM-CSF, divididos en cuatro inyecciones diarias y administradas i.d. en el sitio de vacunación. Aquí presentamos los resultados de 12 pacientes. No se observó toxicidad. La respuesta humoral se midió por la detección en el suero de los pacientes de anticuerpos IgG e IgM anti-VACCIMEL por Western Blot, y la respuesta inmune celular se estimó por DTH. Se observó una gran infiltración de linfocitos T CD8+ en algunas metastasis s.c. extirpadas después de la aplicación de VACCIMEL. Hasta el momento, concluimos que la adición de GM-CSF no parece incrementar sustancialmente las respuestas inmunes humorales o celulares. La dosis tóxica limitante de la combinación de VACCIMEL y GM-CSF no ha sido todavía alcanzada. Pareciera que la vacunación debe ser extendida más allá de cuatro dosis para lograr un incremento importante de la inmunidad.

386. (4027) ANTICUERPOS MONOCLONALES (ACMS) CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO

VASCULAR (VEGF) COMO REACTIVOS PARA INHIBIR LA PROLIFERACION NEOPLASICA. GÓNGORA, ADRIÁN; MLADOVAN, ALEJANDRO; NAPP, MÓNICA; FISZMAN, GABRIEL; SAN MARTINO, JULIO A; LEVI, DIEGO; BALDI, ALBERTO

Instituto de Biología y Medicina Experimental Instituto de Biología y Medicina Experimental, Hospital D. Thomsom

La angiogénesis constituye un proceso limitante en el desarrollo tumoral. El VEGF induce la mitosis de las células endoteliales y se sobre-expresa en diversos tumores. Con el objeto de bloquear este factor pro-angiogénico desarrollamos una serie AcMs contra VEGF los cuales presentaron afinidades y capacidad neutralizante similares. Por ensayos de ELISA de competencia, los AcMs exhiben afinidades (Kd) del orden de 2-3x10⁻¹⁰ M. Mediante el sistema BIAcore se obtuvieron valores de kON en el rango de 1-2x10⁶M⁻¹.s⁻¹, no pudiendo determinarse adecuadamente la kOFF debido a la falta de disociación del complejo. Ello confiere a los mismos características singulares. Dichos anticuerpos carecen de actividad sobre células tumorales en ensayos "in vitro", pero reducen la densidad vascular asociada a tumores "in vivo". En ensayos de proliferación tumoral en ratones atímicos (nu/nu), utilizando células de melanoma humano (Mel/J-IIB) inoculadas Id, el anticuerpo P4F7 (10 y 100 μg/ratón, ip bisemanal), produjo una inhibición del crecimiento tumoral superior al 90% comparado con el grupo control, a los sesenta días de tratamiento. Asimismo, el índice mitótico disminuyó en el tumor de los animales tratados (7 mitosis/mm²) respecto del control (28 mitosis/mm²). En conclusión, los AcMs contra VEGF constituyen potenciales agentes para el tratamiento futuro de neoplasias sólidas en humanos.

387. (4042) ANTICUERPOS MONOCLONALES (ACMS) CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) COMO REACTIVOS PARA INHIBIR LA PROLIFERACION NEOPLASICA. GONGORA, ADRIAN; MLADOVAN, ALEJANDRO; NAPP, MONICA; FISZMAN, GABRIEL; SAN MARTINO, JULIO; LEVI, DIEGO; BALDI, ALBERTO

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET

La angiogénesis constituye un proceso limitante en el desarrollo tumoral. El VEGF induce la mitosis de las células endoteliales y se sobre-expresa en diversos tumores. Con el objeto de bloquear este factor pro-angiogénico desarrollamos una serie AcMs contra VEGF los cuales presentaron afinidades y capacidad neutralizante similares. Por ensayos de ELISA de competencia, los AcMs exhiben afinidades (Kd) del orden de 2-3x10⁻¹⁰ M. Mediante el sistema BIAcore se obtuvieron valores de kON en el rango de 1-2x10⁶M⁻¹.s⁻¹, no pudiendo determinarse adecuadamente la kOFF debido a la falta de disociación del complejo. Ello confiere a los mismos características singulares. Dichos anticuerpos carecen de actividad sobre células tumorales en ensayos "in vitro", pero reducen la densidad vascular asociada a tumores "in vivo". En ensayos de proliferación tumoral en ratones atímicos (nu/nu), utilizando células de melanoma humano (Mel/J-IIB) inoculadas Id, el anticuerpo P4F7 (10 y 100 μg/ratón, ip bisemanal), produjo una inhibición del crecimiento tumoral superior al 90% comparado con el grupo control, a los sesenta días de tratamiento. Asimismo, el índice mitótico disminuyó en el tumor de los animales tratados (7 mitosis/mm²) respecto del control (28 mitosis/mm²). En conclusión, los AcMs contra VEGF constituyen potenciales agentes para el tratamiento futuro de neoplasias sólidas en humanos.

HEMATOLOGIA III

388. (3488) BAJOS NIVELES DEL RECEPTOR C-MPL Y UNA NUEVA MUTACIÓN DEL FACTOR CBFA2 EN UNA FAMILIA CON DESORDEN PLAQUETARIO FAMILIAR Y

PREDISPOSICIÓN A NEOPLASIAS MIELOIDES (DPF/NM). HELLER, PAULA G; GLEMBOTSKY, ANA C; MARTA, ROSANA F; LAGUNA, SUSANA; GANDHI, MANISH J; CUMMINGS, CARRIE; DRACHMAN, JONATHAN G; MOLINAS, FELISA C

IDIM A Lanari Hematología Investigación, IDIM A Lanari, Fac Medicina, UBA, Puget Sound Blood Center, Seattle, USA.

DPF/NM, caracterizado por trombocitopenia autosómica dominante y propensión a neoplasias mieloides, es causado por mutación del factor de transcripción CBFA2, cuyo defecto interfiere con la megacariocitopoyesis por mecanismos poco claros. Evaluamos la Trombopoyetina (Tpo), citoquina fundamental en la megacariocitopoyesis, y su receptor c-MPL en 3 pacientes de 1 familia con DPF/NM. I:1 falleció por leucemia mielomonocítica crónica. Sus 2 hijas (II:1; II:2) y nieta (III:1) presentan plaquetas $62 \times 10^9/l$, $140 \times 10^9/l$ y $90 \times 10^9/l$, respectivamente y alteraciones en la agregación plaquetaria. Los niveles plasmáticos de Tpo por ELISA fueron 200, 47 y 98 pg/ml en II:1, II:2 y III:1 respectivamente, normal: no dosable-78 pg/ml. Se evaluó la expresión de c-MPL en plaquetas por citometría de flujo con Ac anti c-MPL, calculándose cociente entre fluorescencia c-MPL respecto a isotipo (MPL/iso), normal 1.62 ± 0.23 . Se constató ausencia de marcación en II:1 y III:1 y disminución en II:2, MPL/iso 1.25. Por Western Blot, se evaluó el contenido plaquetario de c-MPL respecto al de integrina βIII , expresándose como porcentaje del normal, el cociente entre ambos. Se hallaron bajos niveles de c-MPL en las 3 pacientes, II:1, 17%; II:2, 50%; III:1, 16%. Por inmunoblotting con Ac anti-fosfotirosina, se demostró ausencia de fosforilación en tirosina de proteínas plaquetarias luego de estimulación con Tpo en 2 pacientes. Por secuenciación, el gen c-MPL fue normal pero se halló mutación no descrita en CBFA2 (P245fs X252). Se investigará si esta mutación altera la unión al ADN de la proteína truncada. Resulta de interés la presencia de 2 sitios consenso de unión al ADN para CBFA2 en el promotor del c-MPL. Se describe por 1º vez una mutación del CBFA2 que causa disminución en la expresión del c-MPL, lo cual podría explicar la trombocitopenia en estos pacientes.

389. (3704) RELACION ENTRE RECEPTOR SOLUBLE DE TRANSFERRINA Y FERRITINA SERICA PARA EVALUAR DEPOSITOS DE HIERRO EN EL POST PARTO. LANGINI, SILVIA HAYDEE; FLEISCHMAN, SILVANA; LOPEZ, LAURA BEATRIZ; MORATAL IBAÑEZ, LAURA; ORTEGA SOLER, CARLOS RAFAEL; PM DE PORTELA, MARÍA LUZ

Cátedra de Nutrición. Ftd de Farmacia y Bioquímica (UBA) Escuela de Nutrición. Ftd de Medicina (UBA), Servicio de Obstetricia Hosp.D.Paroissien, Pcia Bs.As.

La ferritina sérica (FS) es un indicador de depósitos de hierro (Fe) cuestionable en el post parto, no existiendo acuerdo en los puntos de corte. En cambio, el receptor soluble de transferrina (RsT) resultaría más confiable. Para comparar la utilidad de ambos indicadores se estudiaron 88 mujeres atendidas en el Hospital D. Paroissien. En sangre venosa, obtenida en las 24 h post-parto, se determinó: Hematocrito (Hto), Hemoglobina (Hb), recuento de glóbulos rojos (GR) y de glóbulos blancos (GB) (contador electrónico MEGA); en suero: RsT (ELISA, Orion Diagnostica), FS (ELISA, Boehringer) y Proteína C-Reactiva (PCR) (BioSystems). Se analizó la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) de la FS mediante el modelo ROC (Receiver Operating Characteristics, software Med Calc), tomando al RsT como "estándar de oro". Los valores de los indicadores (media \pm DE y rangos) fueron: Hto (%) 35 ± 5 (22-47); Hb (g/L) 112 ± 17 (61-150); GRx10((3))/mm((3)) 3843 ± 530 (2500-5300); GB/mm((3)) 9644 ± 2599 (5300-21000); RsT (mg/L) 4.93 ± 2.93 (0.54-14.77); FS (μ g/L) 33 ± 39 (0-210); PCR (+) en 92.4% de los casos. El porcentaje de mujeres con anemia (Hb < 100 g/L) fue 22.7% y con FS < 100 μ g/L, valor aconsejado para indicar depleción de depósitos de Fe, 27.3%. Sin embargo, la FS evidenció la mayor Se (82.5%) (área bajo la curva de 0.763, IC

95%: 0.655-0.851), para un punto de corte de 25 μ g/L. El % de mujeres con FS < 25 μ g/L fue de 51%. Además, FS correlacionó con RsT ($r = -0.378$; $p = 0.000274$) y con RsT/FS (propuesto por Skikne et al) ($r = -0.935$). Estos resultados sugieren: a) FS sería un indicador confiable de depósitos de Fe, pese a la positividad de la PCR; b) los valores de FS < 25 μ g/L y la relación RsT/FS > 100 se podrían sugerir como indicativos de depósitos deplecionados de Fe en el puerperio. Subsidio B-009, UBA

390. (3753) ESTUDIO DE ACTIVACIÓN DE MONOCITOS EN SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS. GOETTE, NORA; MARTA, ROSANA; MOLINAS, FELISA

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari

Los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMC) son enfermedades clonales que se caracterizan por la superposición de las características hematológicas halladas en los pacientes. En la mielofibrosis con metaplasia mielóide se ha reportado que los monocitos tienen un rol en el depósito de colágeno y la proliferación de fibroblastos en médula ósea. En este trabajo se evaluó la activación de monocitos en SMC. Para esto estudiamos la expresión del receptor de IL-2 (CD25) en monocitos de sangre periférica y luego de su adhesión al poliestireno, y evaluamos la producción de IL-1 β en células mononucleares de sangre periférica en cultivo en 14 pacientes con distintos SMC. Se extrajo sangre en forma estéril, se separó la fracción mononuclear y se determinó la expresión del CD25 por citometría de flujo. La población de monocitos se identificó por el CD14. Parte de las células se cultivaron en medio IMDM con albúmina al 2%. A las 18 hs se despegaron las mismas de la placa y se determinó la expresión de CD25 y la liberación de IL-1 β al sobrenadante de cultivo. La expresión de CD25 en los pacientes fue de baja intensidad y no difirió del grupo control. Post cultivo se observó un aumento similar en la marcación de ambos grupos. En el caso de la IL-1 β , se obtuvieron niveles menores en los pacientes (mediana y rango 430, 34-1031 pg/ml) que en los controles normales (779, 633-1705) ($p = 0.009$). Cuando se discriminó entre los pacientes con y sin tratamiento se observó que la IL-1 β en estos dos grupos era significativamente distinta ($p = 0.005$), siendo más baja en el grupo tratado. En conclusión no encontramos activación de monocitos en pacientes con SMC. Las células mononucleares de estos pacientes liberan niveles menores de IL-1 β en cultivo y el tratamiento acentúa aún más esta particularidad con respecto a los controles normales.

391. (3758) FOSFORILACION EN TIROSINAS DE PROTEINAS PLAQUETARIAS INDUCIDAS POR TGF β . LEV, PAOLA; SALIM, JUAN PABLO; MOLINAS, FELISA

Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MEDICAS A. LANARI

En un trabajo previo se demostró la presencia del receptor de TGF β en la membrana plaquetaria y que la incubación de las plaquetas con TGF β potencia la respuesta plaquetaria en incubaciones de 60 min y la disminuye en incubaciones de 5 min. Para comprender el mecanismo por el cual ocurre este efecto estudiamos la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina como respuesta a la estimulación del receptor con la citoquina. Para esto se evaluó el patrón de fosforilación de proteínas en dos condiciones: 1) inhibiendo la activación plaquetaria con indometacina y teofilina en plaquetas lavadas con PBS, citrato y BSA, en ausencia de agonista y 2) durante la activación plaquetaria utilizando ADP, en plaquetas filtradas por gradiente de metrizamide. Ambos ensayos se realizaron incubando plaquetas durante 60 o 5 min en presencia o ausencia de TGF β . Cuando la muestra con inhibidores se incubó durante 60 min en presencia de la citoquina se observó la aparición de dos proteínas fosforiladas en tirosina correspondientes a 64 y 80 kd, esta última identificada como cortactina. Estas bandas no se observaron en la muestra incubada durante 5 min. En el patrón de proteínas fosforiladas en tirosina obtenido durante la activación plaquetaria con ADP de la muestra incubada durante 5 min en presencia de la citoquina se observó una disminución

en la intensidad de dos bandas, de 100 y 105 kd, con respecto al control. No se observaron diferencias cuando la muestra se incubó durante 60 min. La presencia de las bandas de 64 y 80 kd concordaría con el efecto estimulante observado en la agregación durante la incubación de las plaquetas por 60 min en presencia de TGF β y la disminución de las bandas de 100 y 105 kd con el efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria.

392. (3773) LOS NUCLEOTIDOS CICLICOS REGULAN LA APOPTOSIS DE MEGACARIOCITOS INDUCIDA POR OXIDO NITRICO. POZNER, ROBERTO G; NEGROTTO, SOLEDAD; GÓMEZ, RICARDO M; D'ATRI, LINA P; MAUGERI, NORMA; LAZZARI, MARIA A; SCHATTNER, MIRTA

Academia Nacional de Medicina Depto de Farmacología, Fac de Odontología, UBA.

Previamente demostramos que la prostaciclina (PGI) previene la apoptosis de megacariocitos (MCs) inducida por óxido nítrico (ON). En este trabajo estudiamos los mecanismos involucrados. Los MCs se purificaron por inmunoselección magnética positiva luego de 10-12 días de cultivo de células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano estimulados con trombopoyetina (TPO). La apoptosis se evaluó por microscopía de fluorescencia y citomefluorotría. De manera similar a la PGI, el Dibutilil-cAMP (análogo del cAMP) y los inhibidores de fosfodiesterasas IBMX y Ro-20-1724 inhibieron la inducción de apoptosis por DETA/ON (C:14 \pm 3, ON:51 \pm 7, PGI+ON:25 \pm 3, Dib-cAMP+ON:32 \pm 4, IBMX+ON:28 \pm 5, Ro-20-1724+ON:34 \pm 3 % de apoptosis (ap),n=5). La inhibición de la PKA mostró una reversión significativa de la protección por PGI (36 \pm 3 % ap,n=4). Por otra parte, la TPO protegió la apoptosis inducida por ON y potenció la actividad antiapoptótica de la PGI (24 \pm 2 y 14 \pm 1 % ap respectivamente,n=3). Los niveles de cAMP y cGMP se determinaron por ELISA (tabla,n=3). El 8-Br-cGMP indujo apoptosis en forma concentración dependiente y el inhibidor de guanilato ciclasa ODQ previno la apoptosis inducida por ON (37 \pm 3) demostrando la implicancia del cGMP en la muerte de MCs mediada por ON.

	cAMP (nM)	cGMP (nM)
Control	0.21 \pm 0.07	1.12 \pm 0.34
ON	0.44 \pm 0.09	4.03 \pm 0.79
PGI+ON	5.03 \pm 0.72	0.60 \pm 0.18
TPO+ON	2.51 \pm 0.24	1.65 \pm 0.21

Contrariamente a su efecto en plaquetas, los dos principales inhibidores de la función plaquetaria, el ON y la PGI, gatillan respuestas opuestas en MCs involucrando una relación de los nucleótidos cíclicos del tipo yin-yang.

TRANSDUCCION DE SEÑALES II

393. (3513) EL INHIBIDOR DE QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS P19INK4D AUMENTA LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS DE LEYDIG MA-10 PARA REPARAR EL DNA. MARAZITA, MARIELA; SCASSA, MARÍA; CERUTI, JULIETA; PATRIGNANI, ZORAIDA; PIGNATARO, OMAR; CÁNEPA, EDUARDO

Laboratorio de Biología Molecular-Depto Química Biológica-FCEyN-UBA Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de señales, IBYME-CONICET-UBA

La familia de proteínas INK4 incluye 4 polipéptidos que se unen a las quinasas CDK4/6 interrumpiendo la formación de las holoenzimas dependientes de ciclina D, previniendo la fosforilación de la proteína retinoblastoma y bloqueando así la entrada a la fase S del ciclo celular. Considerando que la p19INK4d, si bien ubica, se expresa mayoritariamente en cerebro y testículo y habiendo analizado previamente los cambios en la expresión de p19INK4d en células de neuroblastoma sometidas a radiación UV de 20 mJ/cm 2 , estudiamos el comportamiento de este gen fren-

te al mismo daño, en células de testículo con el objetivo de analizar su posible participación en la reparación de DNA. Ensayos de Northern blot demostraron que la p19INK4d se induce de manera específica a las 12 h luego de UV en cultivos primarios de Leydig y en células MA-10, hecho que se correlaciona con el arresto en G1. Se evaluó el efecto de p19 sobre la reparación de DNA irradiado con UV en células MA-10. Por medio del ensayo HCR (host cell reactivation) observamos que la sobreexpresión de p19 mejora la capacidad de éstas células para reparar el DNA dañado por UV 80 mJ/cm 2 en un 72%. Por el contrario la disminución del mRNA de p19INK4d mediante el tratamiento con oligonucleótidos antisentido causó una marcada reducción del grado de reparación. La presencia de mimosina (bloqueante de la progresión a S) o la sobreexpresión de una CDK4 mutante sin actividad quinasa aumentó la reparación sólo un 24%. Por último, la cotransfección de las células con una CDK4 mutante incapaz de unir INK4 pero con actividad quinasa, no modificó el efecto reparador de p19INK4d. Nuestros resultados demuestran la participación de p19INK4d en la reparación del DNA sugiriendo un mecanismo independiente de su capacidad de arrestar el ciclo celular en G1.

394. (3596) INDUCCIÓN DE EFECTOS NO-TRANSCRIPCIONALES RÁPIDOS POR ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA) EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO MURINO PROGESTAGENO-DEPENDIENTES. CARNEVALE, ROMINA; SCHILLACI, ROXANA; SALATINO, MARIANA; PROIETTI, CECILIA; RIVAS, MARTÍN; DAROQUI, CECILIA; CHARREAU, EDUARDO; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA; ELIZALDE, PATRICIA V.

Instituto de Biología y Medicina Experimental CONICET Instituto de Oncología "Angel H. Roffo" - UBA

Las hormonas esteroideas son capaces tanto de regular la transcripción génica como de producir efectos no-transcripcionales rápidos. Existen muy pocas evidencias respecto a la inducción de efectos no genómicos por progestágenos en cáncer de mama. El objetivo del presente trabajo fue determinar la regulación por MPA de la activación de ERK-1 y ERK-2 y de PI-3K/AKT en células de carcinoma mamario murino progestágeno-dependientes C4HD, estudiando además, su participación en la inducción de la proliferación celular y la inhibición de la actividad de proteasas por MPA. El tratamiento de las células C4HD con MPA (10nM) durante 10 minutos aumentó los niveles de fosforilación de ERK-1 y 2 (72 \pm 7%) y de AKT (170 \pm 20%) (ensayos de Western Blot). Este efecto fue revertido totalmente por la presencia del antiprogéstano RU486 (10nM). La proliferación de C4HD inducida por MPA (ensayo de incorporación de [3H]timidina) disminuyó significativamente luego del tratamiento con el inhibidor específico de MEK-1, PD98059 (32 \pm 6%), o el inhibidor de PI-3K, wortmanina (32 \pm 5%). La inhibición de la actividad de las metaloproteasas 9 y 2 por MPA fue revertida sólo por el tratamiento de las células C4HD con wortmanina (1 μ M). Sin embargo, la disminución de la actividad del activador de plasminógeno tipo urokinasa (uPA) por MPA fue revertida sólo en presencia de PD98059 (10 μ M). Estos resultados demuestran que la rápida activación de las ERKs y la PI-3K por MPA podría estar involucrada en la modulación de la proliferación celular y de la actividad de proteasas por el progestágeno. Los efectos no genómicos inducidos por MPA están mediados por el receptor clásico de progesterona.

395. (3603) INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE EL RECEPTOR DE PROGESTERONA (PR) Y STATS (PROTEÍNAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN) EN CÁNCER DE MAMA. PROIETTI, CECILIA JAZMÍN; SALATINO, MARIANA; SCHILLACI, ROXANA; CARNEVALE, ROMINA; CHARREAU, EDUARDO; ELIZALDE, PATRICIA V

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET

El presente trabajo estudia la capacidad del acetato de medroxiprogesterona (MPA) de activar Stat3 en células C4HD progéstágeno-dependientes, provenientes de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA. El tratamiento con MPA de las células C4HD durante 48hs indujo un aumento significativo a nivel proteico en la expresión de Stat3. Además, la estimulación con MPA durante 5 a 10 minutos, produjo la fosforilación de Stat3 en el residuo tirosina 705 y promovió su translocación al núcleo. Mediante ensayos de coimmunoprecipitación, encontramos que el MPA induce una rápida asociación del PR y de Stat3 en células C4HD. Ensayos de DNA mobility shift mostraron que el MPA fue capaz de inducir la unión de Stat3 a su elemento respondedor en el DNA (Sis inducible element, SIE). La presencia de Stat3 en los complejos DNA/proteína fue demostrada realizando supershifts en presencia de un anticuerpo anti-Stat3. El uso del antagonista de progéstágenos RU 486 resultó en la inhibición de la capacidad del MPA de inducir la unión de Stat3 a su elemento respondedor, lo cual indica que los efectos del MPA son mediados a través del clásico PR. Ensayos de transfección transiente con un plásmido conteniendo 4 copias de la secuencia de alta afinidad de Stat3, m67, clonadas río arriba de un gen reportero LUC, demostraron que el MPA fue capaz de aumentar significativamente la actividad luciferasa. Estos resultados demuestran por primera vez que el MPA induce la activación transcripcional de Stat3 utilizando el clásico PR en células de carcinoma mamario murino.

396. (3654) EPAC COMO UN INTERCAMBIADOR DE NUCLEOTIDOS DUAL. HOCHBAUM, DANIEL; TRIGO, ROMINA; ALTSCHULER, DANIEL; COSO, OMAR A.

LFBM Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA

Diversos procesos celulares, tales como crecimiento, muerte celular o diferenciación ocurren mediante cascadas de señalización. Uno de los sistemas mejor caracterizados son los que utilizan pequeñas proteínas G (ppG), cambiando su molécula de GDP asociada por GTP, en presencia de algún estímulo (factor de crecimiento, citoquina, stress ambiental, etc). Dicha activación se da con la ayuda de algún factor intercambiador (GEF). La forma activa (GTP), es capaz de activar una cascada de proteínas quinasas que modifican la transcripción de genes blanco. Epac es un GEF cuya regulación esta dada por la unión directa de una molécula de AMPc, análogamente a la PKA (proteína quinasa A). Al unirse el AMPc, Epac es capaz de intercambiar GDP/GTP sobre una subfamilia de pequeñas proteínas G emparentadas con Ras, llamadas Rap (Ras proximate), siendo hasta hace poco la única función conocida de Epac. Recientemente, hemos demostrado que Epac es capaz de activar a JNK, una MAPK activable por stress o citoquinas, independientemente a la activación de Rap. Formas activas de Rap (G12V) no activan a JNK, mientras que si lo hace una mutante de Epac, que carece del dominio intercambiador. Sobre-expresando dominantes negativas de la vía de JNK vemos que dicha activación se produce por un aumento de formas unidas a GTP en Rac y Cdc42, otra familia de (ppG). Por co-inmunoprecipitación con Rac y Cdc42 hemos logrado bajar a Epac, demostrando que Epac, Rac/Cdc42 y posiblemente un GEF de la familia Rho/Rac/Cdc42 forman parte de un complejo multiproteico que modula el intercambio (RapGTP vs. Rac GTP) en respuesta a agonistas. Conclusión: Epac envía señales a JNK a través de su cascada de activación, promoviendo la carga de GTP sobre Rac/Cdc42 gracias a su actividad GEF dual.

397. (3972) EFECTOS NO GENÓMICOS DE PROGESTERONA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE ENDOMETRIO. VALLEJO, G¹; BALLARE, C²; LINO BARAÑO, J; BEATO, M²; SARAGUETA, P¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET Fac de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. ²Centre de Regulació Genòmica (C.R.G), Barcelona, España

La progesterona (P4) estimula la proliferación de las células estromales del endometrio. El objetivo del presente trabajo es

estudiar la proliferación disparada por efectos rápidos de P4. El efecto sobre la proliferación se reprodujo en células de la línea estromal de útero de rata U111 cultivadas en presencia de suero charcolizado (FBS-Ch) 10% tratadas continuamente con P4 durante 5 días. El efecto de la progesterona también se observó cuando la hormona se agregó durante una hora de cultivo y las células se mantuvieron durante 5 días de cultivo en ausencia de P4. El tratamiento con un inhibidor de MAPK, PD98059 (PD) y el antagonista esteroideo, ICI 182,780 (ICI), inhiben la respuesta a P4. Esto sugiere un efecto rápido de la progesterona mediado por la activación de ERK, que involucraría la participación del receptor de E2. P4 (10-8 M) y el agonista R5020 (10-8M-10-11M) incrementan la activación de ERK1-2. RU486 (10-9M), antagonista de P4; ICI (10-8M) o PD (50?M) bloquearon la actividad de R5020 (10-11M). La proliferación dependiente de P4 se confirmó por ensayos de incorporación de 3H-timidina (Control: 441 ± 192 cpm, P4 10-7M: 2354 ± 668 cpm, P4 10-8M: 6854 ± 1316 cpm, EGF: 17437 ± 2953 cpm) y citometría de flujo (Control: G1: 76.1, G2: 4.3, S: 19.6%; R5020 10-8M: G1: 63.7, G2: 5.6, S: 30.8%) luego de 24hs de tratamiento con P4 o R5020. Ni el tratamiento con R5020 ni el tratamiento con estradiol induce la diferenciación celular en estas condiciones. Sin embargo, el agregado de ambas hormonas en combinación produce cambios morfológicos asociados a la decidualización y un aumento de la expresión de desmina. Estos resultados sugieren que la línea celular U111 es un modelo útil para estudiar el efecto del estrógeno y la progesterona en el estroma endometrial.

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS POSTER

INFECTOLOGIA I

398. (3387) HIERRO Y ÓXIDO NÍTRICO: DETERMINACIONES POR RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (EPR) EN UN MODELO DE ENDOTOXEMIA. GALLEANO, MONICA; ALCALDE, MYRIAM; AIMÓ, LUCILA; PUNTARULO, SUSANA

Fisicoquímica-PRALIB, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA.

El objetivo de este trabajo fue estudiar en un modelo de endotoxemia o shock séptico el efecto del óxido nítrico (NO) sobre la movilización de hierro (Fe) y el estrés oxidativo en plasma. El modelo de endotoxemia consistió en la administración de lipopolisacárido de Escherichia coli (serotipo 0127:B8) (ip 4 mg/kg) (LPS) a ratas Sprague-Dawley obteniéndose muestras durante las 6 h posteriores al tratamiento. Se utilizó espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) para la determinación de NO unido a hemoglobina en sangre (NO-Hb), radical ascorbilo (A.) y Fe unido a compuestos de bajo peso molecular en hígado. Los resultados mostraron un incremento significativo en el contenido de NO-Hb en sangre durante las primeras 6 h de la administración de LPS. El índice A./AH- plasmático (AH= ascorbato, determinado por HPLC), como índice de estrés oxidativo, se incrementó en un 73% a las 6 h. En el mismo período, el contenido de grupos carbonilos de las proteínas plasmáticas se incrementó significativamente (0.90±0.09 nmol/mg prot y 1.15±0.08 nmol/mg prot, respectivamente). Ni el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y ni los niveles de grupos tioles se modificaron significativamente por el tratamiento. El Fe plasmático disminuyó significativamente (30±5 uM y 13±3 uM en animales controles y tratados 6 h, respectivamente) mientras que el Fe unido a compuestos de bajo peso molecular en hígado se incrementó en el mismo período. Estos resultados muestran que en este modelo de endotoxemia la relación A./AH- es un índice sensible de estrés oxidativo en plasma y que el aumento en la disponibilidad de hierro catalíticamente activo en hígado podría reflejar la re-localización del hierro plasmático. Financiado por ANPCyT, IUPAB, CONICET y UBA.

399. (3423) TRATAMIENTO CON BENZNIDAZOL Y TIORIDAZINA EN LA FASE CRÓNICA DE LA INFECCIÓN CON TRYPANOSOMA CRUZI MEJORA LA SOBREVIDA Y LA CARDIOPATÍA. BUSTAMANTE, JUAN M.; RIVAROLA, WALTER H.; LO PRESTI, SILVINA M.; FERNÁNDEZ, ALICIA R.; ENDERS, JULIO E.; PAGLINI, PATRICIA A

Universidad Nacional de Córdoba Fac de Ciencias Médicas Cátedra de Física Biomédica Cátedra de Física Biomedica, Fac. de Cs. Médicas, UNC. Santa Rosa 1085 CP:5000 Córdoba Argentina.

La enfermedad de Chagas causada por el *Trypanosoma cruzi*, es una de las endemias más difundidas de América Latina. La terapia antiparasitaria esta indicada en la fase aguda, mientras que en la etapa crónica el uso de drogas tripanocidas es controvertido. En el presente trabajo se analizó el tratamiento en la etapa crónica de la enfermedad con una droga de uso tradicional como Benznidazol (BZ) y con Tioridazina (THI) droga de uso habitual en psiquiatría cuyo efecto tripanocida fue previamente estudiado en la etapa aguda. Se utilizaron ratones albino suizos separados en grupos: Infectados con 50 T. cruzi y sin tratamiento; infectados con 50 T. cruzi tratados con BZ, 100 mg/kg/día/20días, vía oral, comenzando a los 180 días post-infección (d.p.i.); infectados con 50 T. cruzi tratados con THI 80 mg/kg/día durante 12 días, a los 180 d.p.i. vía oral. La sobrevida se monitoreo diariamente y la electrocardiografía se llevo a cabo a los 180, 215 y 320 d.p.i. Los datos fueron comparados por análisis de varianza y Chi cuadrado. Los ratones tratados con THI o BZ presentaron una sobrevida mayor (77 y 100%) que los no tratados (26%) a los 320 d.p.i. ($p < 0.01$). Las alteraciones electrocardiográficas disminuyeron significativamente en los ratones tratados con BZ y THI (33 y 43%) con respecto a los no tratados a los 320 d.p.i. ($p < 0.01$). Estos resultados muestran claramente que el tratamiento con en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas experimental produce una mejora en la actividad eléctrica del corazón y en la sobrevida de la población tratada.

400. (3430) EFECTO DE DISTINTAS CEPAS DE T. CRUZI EN LA MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA AGUDA EXPERIMENTAL. FERNÁNDEZ, A.RUTH; VASSIA, MARÍA E.; PATTI, CINTIA; BUSTAMANTE, JUAN M.; RIVAROLA, WALTER; LO PRESTI, SILVINA; FRETES, RICARDO; ENDERS, JULIO; PAGLINI, PATRICIA

Facultad de Cs. Médicas. U.N.C

Una de las manifestaciones más importantes de la enfermedad de Chagas es el desarrollo de miocarditis con alteraciones electrocardiográficas y lesiones irreversibles. Además es conocido que la variabilidad en la sintomatología de la enfermedad está relacionada con las características genéticas del huésped y/o con la variabilidad genética del parásito. En el presente resumen se describe la respuesta del miocardio del huésped frente a tres cepas diferentes de *T. cruzi* (Tulahuen, SGO-Z12, y cepa recientemente aislada de paciente). Se utilizaron ratones albino suizos de 30 ± 1 g de peso y fueron divididos en cuatro grupos, uno control y los tres restantes inoculados respectivamente con trypomastigotes de *T. cruzi*, de cada una de las cepas. En todos los casos se efectuó control de parasitemia, análisis histopatológico, registro electrocardiográfico y medición de afinidad y densidad de receptores β -cardíacos. Todos los estudios fueron realizados durante la etapa aguda (30 días post-inoculación). La parasitemia fue significativamente superior en el grupo infectado con cepa Tulahuen, esto concuerda con los hallazgos histopatológicos que fueron más intensos y frecuentes. Los registros electrocardiográficos no mostraron diferencias entre los tres modelos, incrementando la proporción de disfunciones con respecto a los controles ($p < 0,05$). La afinidad de los receptores β fue significativamente menor en los tres grupos ($5,6 \pm 0,2$; $5,7 \pm 0,5$; $6,6 \pm 0,6$ nM) con respecto al control ($3,6 \pm 0,05$ nM) ($p < 0,05$), incrementado la densidad de los mismos sólo en el grupo infectado con la cepa SGO-Z12 ($207,6 \pm 8,1$ fmol/mg.proteínas) con

respecto a los demás grupos. Las respuestas observadas muestran que las tres cepas de *T. cruzi* analizadas expresan su tropismo hacia el miocardio, pero se diferenciaron en la intensidad de las lesiones en el mismo, de acuerdo a la cepa empleada para provocar la infección.

401. (3632) LA REGULACION DEL NIVEL DEL HEMO EN BRUCELLA ABORTUS AFECTA SU CAPACIDAD DE SOBREVIDA INTRACELULAR. MARTINEZ, MARIA MARCELA; UGALDE, RODOLFO A; ALMIRON, MARTA A

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB, INTECH), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional de General San Martín (CONICET-UNSAM), San Martín 1650, Argentina

B. abortus, agente causal de la brucelosis bovina, infecta al hombre produciendo un cuadro de fiebre ondulante. *Brucella* spp. es un patógeno intracelular facultativo, cuya virulencia radica en su capacidad de replicar intracelularmente. Recientemente describimos que la síntesis del hemo es esencial para su virulencia. Durante la infección la disponibilidad de hierro esta limitada, comprometiendo dicha síntesis. Existe en *Brucella* un homólogo a *Irr*, cuya función en otra bacteria relacionada es la de regular esta ruta metabólica de acuerdo al nivel de hierro. De modo que el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la deficiencia de hierro en la capacidad de replicación intracelular de *B. abortus* y analizar el rol de *Irr* en este proceso. Las infecciones se realizaron empleando el ensayo de protección con gentamicina sobre las líneas celulares HeLa y J774. Asimismo se determinaron por espectrofotometría, en cultivos bacterianos, el contenido del hemo empleando el reactivo tetrametilbencidina, y la actividad de la enzima catalasa (una hemoproteína) por el método de Beers. Los resultados indicaron que la depleción de hierro afectó la capacidad replicativa de la cepa virulenta. La cepa mutada, en tanto, alcanzó niveles de replicación que resultaron independientes del nivel de hierro. El mutante mostró un contenido de hemo 2 veces mayor al de la cepa virulenta y un incremento de 20 veces en la actividad específica de la catalasa. Concluimos entonces que: 1) La deprivación nutricional de hierro afecta la capacidad de replicación intracelular de *B. abortus*. 2) *Irr* regula negativamente la síntesis del hemo, reduciendo así el contenido de hemoproteína(s) y afectando la capacidad de sobrevida intracelular. Esto coincide con lo ya reportado sobre la importancia de esta vía en *B. abortus*.

402. (3672) TRANSMISION MATERNO-FETAL EN EMBARAZADAS CON ENFERMEDAD DE CHAGAS AGUDA. MORETTI, EDGARDO; CASTRO, IRMA; BASSO, BEATRIZ; CARRIZO, MARIO; CHAUL, MARCELA; CARRIZO, RUBEN; BARBIERI, GUSTAVO; CANAL FEIJOO, DAMASO; SARTORI, MARIA JOSE

Servicio Nacional de Chagas H. Rawson, San Juan; C. Chagas y Pat. Reg. Sgo. del Estero; Fac. C. Méd. U.N.Cba

La transmisión congénita de la Enfermedad de Chagas es actualmente una de las vías de mayor relevancia epidemiológica, debido a la disminución en la transmisión vectorial. Los estudios sobre su incidencia se han realizado en embarazadas en período indeterminado o crónico. En este trabajo se presentan tres casos de infección chagásica aguda durante el embarazo, con el objeto de analizar la evolución materna y la infección o no del recién nacido. Se estudiaron madre e hijo mediante clínica, parasitología y serología. Caso 1) Mujer de 30 años, 32 semanas de gestación, infección accidental, enfermedad aguda severa, parasitología positiva. Cesárea a las 36 semanas. Recién nacido (RN) asintomático, parasitología y serología negativas hasta el año de vida. Caso 2) 17 años, 28 semanas de gestación, infección vectorial, Complejo oftalmoganglionar, (COG), parasitología (+). Parto a término, cesárea. Amastigotes en placenta. RN sano, parasitología y serología (-). Caso 3) 19 años,

20 semanas de embarazo, COG, Strout (+). Parto natural, a término. RN con clínica y parasitemia al nacer. Niveles de anticuerpos similares en madre-niño. En los dos casos en que la infección materna ocurrió en el tercer trimestre y los partos fueron por cesárea no hubo transmisión. Cuando la infección fue en el inicio de la gestación, el niño nació infectado. La carga parasitaria no fue determinante en la transmisión, ya que, a pesar de la elevada parasitemia en dos de las madres, no hubo infección congénita. Estos resultados pueden aportar datos para conocer algunos de los factores involucrados en la transmisión (edad gestacional en el momento de la infección, tipo de parto) y plantean la necesidad de evaluar conductas médico-terapéuticas en embarazadas con infección chagásica aguda.

403. (3701) PRESENCIA DE LA PROTEÍNA DPS EN VESÍCULAS QUE CONTIENEN DNA LIBERADAS POR ESCHERICHIA COLI ENTEROAGREGATIVA. ALMIRÓN, MARTA; SANJUAN, NORBERTO

Facultad de Medicina UBA Instituto de Investigaciones Biotecnológicas. Universidad Nacional de General San Martín

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) es un patógeno causante de diarreas crónicas infantiles. Anteriormente reportamos que cuando EAEC se encuentra en la fase estacionaria del cultivo bacteriano produce y libera vesículas conteniendo ácidos nucleicos fuertemente unidos a proteínas. Una de las proteínas que se unen inespecíficamente al DNA para protegerlo del estrés oxidativo es DPS. Esta proteína se expresa mayoritariamente en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. El objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia de DPS en las vesículas liberadas al medio por EAEC durante la fase estacionaria de crecimiento y caracterizar al DNA intravesicular. El estudio se realizó con la cepa prototipo de EAEC 17-2 y con un mutante DPS-. Las vesículas fueron purificadas por centrifugaciones diferenciales, por ultracentrifugación y por fraccionamiento en gradientes de densidad discontinuos a partir de sobrenadantes de cultivos bacterianos. La presencia de vesículas y sus características en cada fracción fueron determinadas por microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa. Las proteínas contenidas en las vesículas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa para la identificación de DPS por Western-blot. El DNA intravesicular fue amplificado por RAPD y caracterizado en geles de agarosa. Se identificaron dos poblaciones vesiculares con tamaños y densidades cercanos conteniendo DPS pero con patrones diferentes del DNA. La identificación de DPS en las vesículas liberadas por EAEC durante la fase estacionaria sugiere que el proceso de liberación de DNA en conjunto con una proteína que lo protege del estrés oxidativo estaría regulado genéticamente.

404. (3737) EFECTOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO RECOMBINANTE HUMANA (HCRH) EN UN MODELO DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON TRYPANOSOMA CRUZI (TC). FELDMAN, SARA; SARRIÓ, LEANDRO; DÁVILA, HÉCTOR O.

Fac Cs Médicas UNR Cat. de Quím. Biológica e Inst. Inmunología, Fac. Cs Médicas UNR

El Tc es un protozoario agente infeccioso de la enfermedad de Chagas. Dado que la hormona de crecimiento ejercería una acción estimulante de los macrófagos y puesto que estos estarían implicados en el control de la infección por el parásito, se decidió evaluar el tratamiento con HCrh en la infección experimental. Ratas de la línea "I" de 21 días de edad, se dividieron en cuatro grupos experimentales, n=8 c/u: I y II infectados con 1×10^6 de Tc cepa Tulahuén; III y IV tratados con HCrh, 100 mUI/día/rata durante 19 días; V con solución fisiológica. Se estudió: 1) la parasitemia a los 6 y 10 días post-infección, contando los pará-

sitos en cien campos a 450x, de 5µl de sangre eúterea, colocada entre porta y cubreobjeto de 22x22 mm. 2) la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales frente a globulos rojos de conejo, a los 20 días post-infección. Se contaron 300 células y se obtuvo el porcentaje de fagocitosis. Los niveles de parásitos circulantes se informan como mediana y rango: 6 días post infección (p.i); Grupo I: 18, 6-34; Grupo II: 6, 4-10; $p < 0.003$ y a 10 días p.i, Grupo I: 24, 9-105; Grupo II 7, 3-23; $p < 0.0005$, Test de la mediana. La capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales fue: $X \pm es$ y (% de fagocitosis), Grupo I: 187 ± 17 (62); Grupo II: 134 ± 12 (78); Grupo III: 205 ± 3 (68); Grupo IV: 129 ± 2 (43): I vs IV $p < 0.001$; II vs III $p < 0.001$; III vs IV $p < 0.001$. Test est. X(2) HCrh podría regular el curso de la infección con Tc, ejerciendo efectos activadores sobre células del sistema inmune, como los macrófagos, los cuales presentan receptores para esta hormona. Esto se traduciría en mayor efectividad para eliminar patógenos intracelulares. Estudios de activación de macrófagos y producción de metabolitos tóxicos dependientes del oxígeno brindarían mayor información.

405. (3800) LA INFECCION DE QUEMADURAS POR P. AERUGINOSA MODULA LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO EN LA LESION EN FORMA DIFERENCIAL EN RATONES NORMALES Y DIABETICOS NO OBESOS (NOD). VALDEZ, JUAN CARLOS; CALAFAT, MARIO; PERAL, MARIA C.; CASTILLO, FERNANDA; AISEMBERG, JULIETA; FRANCHI, ANA; PEREZ LEIROS, CLAUDIA

Departamento de Química Biológica, FCEN (UBA)-CONICET Cátedra de Inmunología, F. Bioquímica, Q y F, Universidad Nacional de Tucumán y CEFYBO-CONICET

P. aeruginosa (P.a.) al infectar lesiones inflamatorias modula la síntesis de algunos mediadores y modifica el perfil de citoquinas, favoreciendo el establecimiento de una infección crónica. Previamente describimos interferencias en la señalización de células fagocíticas en un modelo de infección de lesiones por quemadura con P.a. en ratones BALB/c. Se ha demostrado que la óxido nítrico sintasa (NOS) inducible en células del exudado inflamatorio produce un aumento muy pronunciado de NO a diferencia de las otras isoformas y su inducción es inhibida por pequeñas cantidades de NO. NO y prostaglandinas también interactúan entre sí regulando su propia síntesis y modulando la respuesta inflamatoria. Con el fin de investigar si la infección por P.a. induce una regulación de la producción de NO en la lesión y, además, si este efecto se modifica en un modelo de respuesta Th1, estudiamos la producción de nitritos y las UFC en el curso de la infección intralesional de quemaduras en ratones normales BALB/c y en ratones diabéticos no obesos (NOD). Ratones BALB/c y NOD quemados (Q) se infectaron intralesionalmente con 200 UFC (Q+I). Se evaluó el número de UFC y la producción de nitritos por Griess en el exudado. A las 24 horas, la P.a. indujo una disminución significativa en la concentración de nitritos en ratones BALB/c ((µM) Q: $5,7 \pm 1,2$; Q+I: $2,3 \pm 0,3$, $p < 0,05$). En ratones NOD, la infección no redujo la concentración de nitritos como en los normales y, más aun, la producción de nitritos resultó mayor que en los BALB/c (NOD: Q: $3,1 \pm 0,7$; Q+I: $4,2 \pm 0,8$). Esta respuesta diferencial está asociada a un aumento del número de UFC/ml en la lesión de los NOD (BALB/c $2,9.10(4)/ml$; NOD: $7,9 10(5)/ml$). Los resultados indican que existe una respuesta diferencial a P. aeruginosa en la síntesis de NO entre ratones normales y ratones diabéticos de la cepa NOD.

406. (3814) REGULACION TRANSCRIPCIONAL NEGATIVA Y POSITIVA DE LA SINTESIS DE SIDEROFOROS EN BRUCELLA ABORTUS. MARTINEZ, MARIA MARCELA; UGALDE, RODOLFO A.; ALMIRON, MARTA A.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB, INTECH), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional de General San Martín (CONICET-UNSAM), San Martín 1650, Argentina

B. abortus es un patógeno intracelular facultativo causante de la zoonosis denominada brucelosis. Durante la infección, las bacterias patógenas secretan sideróforos para superar la limitación de hierro impuesta por el hospedador. B. abortus produce los sideróforos brucebactina y su precursor el ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA). Los genes que participan en la síntesis del 2,3-DHBA forman un operón cuyo promotor posee motivos de unión al regulador Fur. B. abortus posee dos homólogos a este regulador designados Fur e Irr. El objetivo de este trabajo fue investigar sus roles en la regulación de la síntesis de estos sideróforos. Los estudios se realizaron con la cepa virulenta 2308 y con los mutantes fur- e irr-. Las cepas fueron cultivadas en medios con y sin limitación de hierro. Los sideróforos fueron determinados por HPLC y por los ensayos colorimétricos de Arnow y CAS. La regulación de la síntesis se estudió a través de una fusión transcripcional de lacZ al primer gen del operón. La actividad beta galactosidasa se ensayó por el método de Miller. La presencia de la proteína Irr fue detectada por Western-blot. Se observó por comparación con la cepa 2308, que la ausencia de Fur permitió que el operón se transcriba aún en presencia de hierro. La ausencia de Irr, por el contrario, disminuyó los niveles de ambos sideróforos. Este fenotipo fue revertido por complementación con el gen salvaje. La proteína Irr fue detectada en cultivos crecidos en deficiencia de hierro, y se degradó al incrementarse el contenido del mismo. Concluimos entonces que: 1) Fur regula negativamente la síntesis de sideróforos en presencia de hierro, tal como fuera reportado para otras bacterias. 2) Irr sólo está presente en deficiencia de hierro regulando positivamente esta síntesis.

407. (3886) DETECCIÓN DE INTERLEUQUINA 10 (IL-10) EN PACIENTES CON PANENCEFALITIS ESCLEROSANTE SUBAGUDA (PEES). MISTCHENKO, ALICIA S; FORNARI, M CECILIA; VIEGAS, MARIANA; BARRERO, PAOLA R; DIEZ, ROBERTO A

Hospital de Niños R Gutiérrez Laboratorio de Inmunofarmacología, Facultad de Medicina, UBA

La panencefalitis esclerosante subaguda (PEES) es una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central causada por la infección persistente del virus del sarampión. El principal factor de riesgo es haber padecido sarampión durante el primer año de vida. Aunque la patogénesis permanece desconocida, los pacientes con PEES tienen altos títulos de anticuerpos anti-sarampión en LCR y suero, con impedimento de la respuesta T citotóxica específica para el virus. Una de las hipótesis es el dominio relativo de la respuesta Th2 sobre la Th1, tal vez atribuible a la inmadurez del sistema inmune en el momento de la infección inicial. En 8 pacientes pediátricos con diagnóstico de PEES de acuerdo a los criterios de Dyken, edad promedio 57 meses (rango 40-74 meses) se determinaron los niveles de IL-4 e IL-10 (Th2) e IFN-gamma (Th1) en muestras de LCR obtenidas al momento del diagnóstico. Todos los pacientes presentaron niveles elevados de IL-10 (mediana 36 pg/ml, rango 16-162 pg/ml). En ninguna de las muestras se detectó IL-4 y sólo en un paciente se detectó IFN-gamma (162 pg/ml). Estos resultados pueden ser consistentes con un predominio de la respuesta Th2 sobre la Th1 o con un mecanismo antiinflamatorio local mediado por IL-10.

METABOLISMO Y NUTRICION II

408. (3379) PEROXIDACION LIPIDICA DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATAS SUPLEMENTADAS CON ACIDO LINOLEICO CONJUGADO: EFECTO DE PROTEINA TRANSPORTADORA DE ACIDOS GRASOS. PALACIOS, ALEJANDRO; PIERGIACOMI, VIVIANA; CATALA, ANGEL

Fac. Cs. Veterinarias, Cat. de Bioquímica, UNLP

Numerosos isómeros del Acido Linoleico Conjugado (ALC) se encuentran en la grasa de la leche, en el queso y en la carne de vaca. Investigaciones recientes sobre las propiedades fisiológicas

del ALC muestran que tiene efecto sobre carcinogénesis, composición corporal y sobre Diabetes Mellitus. El ALC dietario ejercería un efecto hipolipidémico. Los hallazgos de que el ALC a bajas concentraciones afecta la tumorigénesis y arteriosclerosis, dan idea de que podría ser efectivo a niveles dietarios normales, y no en las cantidades farmacológicas utilizadas actualmente. En este trabajo se analizó el efecto antioxidante del ALC sobre la peroxidación lipídica de microsomas de hígado, se trabajó con dos lotes de ratas wistar AH/HOK de 7 semanas de vida: grupo ALC (dosis diaria: 30 mg vía oral, durante 10 días) y grupo control. Se incorporó a los ensayos una fracción soluble (F2) enriquecida en Proteína Transportadora de Acidos Grasos (PTAG), obtenida de citosol de ambos grupos, para estudiar su efecto inhibitor de la peroxidación lipídica. La peroxidación se realizó en un sistema in vitro, no enzimático, su cuantificación se realizó midiendo quimioluminiscencia (QL) durante 180 minutos. Analizando QL se observó que el daño peroxidativo disminuyó por la adición de F2control y F2ALC, la emisión lumínica de los microsomas tratados con ALC fué más baja cuando se compararon microsomas de ambos grupos. Estudiando la composición de ácidos grasos nativos vs peroxidados, se observó disminución de los porcentajes de C18:2n-6, C18:3n-3 y C20:4n-6 en grupo control, en grupo ALC solo C20:4n-6; se encontraron diferencias significativas comparando peroxidados de ambos grupos. El análisis de los resultados expuestos permite concluir que la peroxidación lipídica fué menor en microsomas de ratas suplementadas con ALC respecto a grupo control, y que F2 inhibió la peroxidación, siendo mayor el efecto en el caso de F2 del grupo ALC.

409. (3382) PEROXIDACIÓN LIPÍDICA ENZIMÁTICA Y NO ENZIMÁTICA EN MICROSOMAS Y NÚCLEOS DE HÍGADO DE RATA. MARMUNTI, MÓNICA; GAVAZZA, MARIANA; CATALÁ, ANGEL

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP

Los fosfolípidos constituyentes de las membranas biológicas son susceptibles a la oxidación, no sólo por su alto contenido de ácidos grasos polinosaturados, sino además por su asociación en la membrana celular con sistemas enzimáticos y no enzimáticos capaces de generar radicales libres. El objetivo de este trabajo fue estudiar en un sistema experimental in vitro la relación entre la lipoperoxidación enzimática (NADPH) y no enzimática (ascorbato-Fe⁺⁺) en microsomas y núcleos de hígado de rata. La lipoperoxidación se cuantificó por medida de quimioluminiscencia (cpm/mg proteína) durante 3 horas a 37 °C. Los resultados muestran que microsomas y núcleos hepáticos poseen aproximadamente 50-55% de ácidos grasos polinosaturados, siendo C18:1n9, C18:2n6 y C20:4n6 los que se encuentran en mayor proporción. Los valores de emisión lumínica total alcanzados durante la peroxidación lipídica enzimática y no enzimática, fueron más elevados en microsomas que en núcleos. Observamos una disminución significativa de los ácidos grasos C20:4n6 y C22:6n3 en microsomas y núcleos durante la lipoperoxidación inducida por ascorbato-Fe⁺⁺, mientras que en la lipoperoxidación enzimática, sólo se observó diferencia significativa en el contenido de C20:4n6 en microsomas hepáticos. El pico máximo de quimioluminiscencia se obtuvo a los 25 minutos en microsomas y núcleos, incubados con NADPH, mientras que en presencia de ascorbato-Fe⁺⁺ los picos máximos se alcanzaron a los 70 y 40 minutos respectivamente. Los sistemas de lipoperoxidación enzimática y no enzimática funcionan en forma selectiva en microsomas y núcleos de hígado de rata.

410. (3386) PERFIL DE ACIDOS GRASOS Y SENSIBILIDAD A LA PEROXIDACION LIPIDICA EN MITOCONDRIAS DE HIGADO, CORAZON Y CEREBRO DE LONCHURA STRIATA. GUTIERREZ, ANA MARIA; REBOREDO, GUILLERMO R; MOSCA, SUSANA M.; CATALA, ANGEL

Cat. de Bioquímica, Fac. de Cs. Veterinarias; Cat. de Fisiología Animal, Fac. de Cs. Nat. y M, UNLP

El contenido de ácidos grasos y el nivel de antioxidantes de membranas biológicas difiere entre especies y tejidos de la misma especie, lo que podría explicar las diferencias observadas con respecto a la susceptibilidad a la peroxidación lipídica. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar el perfil de ácidos grasos y la sensibilidad a la peroxidación lipídica de las mitocondrias de hígado, corazón y cerebro del ave "manón de rabadilla blanca". (*Lonchura striata*). Las mitocondrias fueron incubadas en un sistema ascorbato-Fe⁺⁺ in vitro, midiendo quimioluminiscencia y variación en la composición de ácidos grasos. El contenido de ácidos grasos no saturados (C18:1n9 + C18:2n6; C20:4n6 y C22:6n3) fue 30%, 7% y 3% en mitocondrias de hígado, 40%, 3% y 2% en mitocondrias de corazón y 40%, 7% y 8% en mitocondrias de cerebro. Las mitocondrias de hígado y cerebro fueron las más afectadas por el proceso de peroxidación lipídica, obteniéndose una disminución de aproximadamente un 50% en los ácidos araquidónico y docosahexaenoico. Las mitocondrias de corazón no fueron afectadas por el proceso de lipoperoxidación y no se observaron cambios en la composición de ácidos grasos. Los resultados sugieren que los ácidos grasos no saturados de mitocondrias de hígado y cerebro son sensibles al daño oxidativo, mientras que las mitocondrias de corazón presentan un bajo grado de no saturación y ausencia de emisión lumínica. Estos factores estarían involucrados en la protección de las mitocondrias de corazón del ave *Lonchura striata* contra el estrés oxidativo, disminuyendo la sensibilidad a la peroxidación lipídica.

411. (3569) LOCALIZACIÓN DE LA HEMO OXIGENASA TIPO I EN MITOCONDRIA Y SU ACCIÓN SOBRE LA OXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL. CONVERSO, DANIELA PAOLA; TAILLE, CAMILLE; CARRERAS, MARÍA CECILIA; BOCZKOWSKI, JORGE; PODEROSO, JUAN JOSÉ

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno Hal. Clínica UBA. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U408, Faculté X. Bichat, Paris, F

La hemo oxigenasa (HO) participa en la degradación del grupo hemo a CO₂, hierro y bilirrubina. presenta dos isoformas: constitutiva (tipo II) e inducible (tipo I) con localización microsomal. En los últimos años, se describió el efecto del óxido nítrico (NO) en la activación de la HO-I y cómo ésta puede modular negativamente la producción de este radical, pero no se ha establecido aún una relación entre la HO-I y la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS). El objetivo de este trabajo es: a) demostrar la presencia de HO-I en mitocondrias de hígado sensible a modulación en actividad y expresión por hemina (activador específico), y b) que esta enzima tiene una modulación inversa a la de la mtNOS. Se utilizó hígado de ratas Sprague Dawley, separándose las fracciones mitocondrial y microsomal. Se determinaron: la actividad de HO y de NOS, como así también la expresión en presencia de hemina (H) o protoporfirina IX (SnPP IX, inhibidor de HO) inyectadas por vía intraperitoneal 24 hs antes de la obtención del tejido. Se determinaron el consumo de oxígeno mitocondrial y la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), como parámetros de funcionalidad mitocondrial. Se observó que en presencia de hemina (microsomos y mitocondrias) aumenta la expresión y la actividad de la HO-I en forma significativa. Este aumento se correlacionó con una disminución de la actividad (-43%), como así también de la expresión (-27%) de la mtNOS. La producción de H₂O₂ dependiente de NO fue menor en las ratas tratadas con hemina (control: 0.017±0.01 vs H: 0.009±0.004 nmoles/min.mg.prot, p<0.05). Los datos sugieren que: a) el aumento de HO-I en forma activa, podría modular la expresión y consiguientemente la actividad de la mtNOS en forma fisiológica y b) este estado puede depender del catabolismo del hemo, que es un cofactor de la mtNOS en términos de transferencia de electrones y de dimerización de la proteína activa.

412. (3867) EFECTO DE POLIFENOLES VEGETALES EN UN MODELO DE PROTOPORFIRIA. MARTINEZ, MARIA DEL CARMEN; AFONSO, SUSANA GRACIELA; BATLLE, ALCIRA

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) – CONICET, FCEN, UBA. Buenos Aires. A

La Protoporfirina Eritropoyética (PPE) se caracteriza por la acumulación de protoporfirina (PP) en eritrocitos, hígado y heces, por deficiencia de la ferroquelatasa (FeCh), responsable de la inserción de Fe en la PP para formar hemo. La precipitación de PP en los canalículos biliares causa colestasis, fibrosis y cirrosis. La Griseofulvina (Gris) es un antimicótico que en animales de laboratorio induce acumulación de porfirinas y cáncer hepático debido a la formación de N-metil porfirinas, que inhiben a la FeCh. Las manifestaciones hepáticas son similares a las encontradas en pacientes con PPE. Hemos observado inducción de estrés oxidativo en ratones tratados con Gris en la dieta. En base a esto, estudiamos el efecto de algunos polifenoles sobre el estrés oxidativo inducido por Gris. Los ratones recibieron ácido elálgico (300 mg/l), quercetina (50 mg/l) o ácido clorogénico (50 mg/l), junto con Gris (0,5%) en la dieta. Los controles recibieron dieta estándar, y los controles para cada polifenol recibieron además el antioxidante en el agua. La actividad de ALA-S, GST y SOD, y las porfirinas hepáticas aumentaron en los animales tratados con Gris o Gris + polifenol ((160 ± 33)%, (140 ± 18)%, (180 ± 41)%, (140 ± 20)%; p<0.01; n=4). El GSH sólo aumentó en los ratones tratados con Gris o Gris + quercetina ((149 ± 33)%, (142 ± 29)%; p<0,01; n=4). Los TBARS mitocondriales y microsomales aumentaron significativamente ((200 ± 64)%, (148 ± 36)%; p<0,01; n=4) en los animales tratados sólo con Gris. Aunque las porfirinas y la actividad de ALA-S permanecieron elevadas, los polifenoles protegieron los hígados de la peroxidación lipídica inducida por las porfirinas acumuladas. Es de esperar que la administración de ácidos biliares que aceleren la excreción biliar de porfirinas, junto con polifenoles, permita una mayor protección frente al daño oxidativo.

413. (3892) ESTUDIOS BIOQUIMICOS Y GENETICOS EN UNA FAMILIA CON PORFIRIA DUAL. MELITO, VIVIANA ALICIA; PARERA, VICTORIA; FERREIRA GOMES, MARIELA; ROSSETTI, MARIA VICTORIA; BATLLE, ALCIRA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA-FCEN-UBA-CIPYP-CONICET

Las Porfirias son enfermedades hereditarias e independientes entre sí. Existen casos raros de coexistencia como Porfiria Cutánea Tardía (PCT) con Porfiria Aguda Intermitente (PAI) o Porfiria Variiegata (PV) conocidos como Porfiria Dual. En estos pacientes se observa una superposición de los signos bioquímicos y clínicos que caracterizan a las dos porfirias. Se presenta el primer caso de Porfiria Dual PCT/ PV. En Argentina las porfirias más frecuentes son PCT y PAI, no así PV, por ello, la probabilidad de encontrarla asociada a otra porfiria es baja. Dos hermanas presentaron sintomatología cutánea compatible con PCT. Las porfirinas urinarias en GW (27 años) fueron 1975 mg/24 h con típico patrón de PCT pero elevado contenido de Coproporfirina (Uro: 36%; Fria: 25%; Hexa: 4%; Penta: 10% y Copro: 25%) mientras que en MW (34 años) fueron de 256 mg/24 hs con patrón alterado pero no típico de PCT (Uro: 4%, Penta: 16% y Copro: 80%) (VN: Copro:100%). Las porfirinas fecales estaban elevadas: GW: 270 mg/g seco (Uro: 2%, Fria: 1%; Hexa: 1%, Penta:10%, Copro:35%, Isocopro:15% y Proto:36%); para MW: 896 mg/g seco (Uro: 2%, Fria: 1%; Hexa: 1%, Penta:2%, Copro:35%, Isocopro:10% y Proto:49%), valores típicos de PV. El índice de porfirinas plasmáticas (IPP) fue: GW, IPP: 4,33, lem: 618 nm, característico de PCT; MW, IPP:6,20 a lem. 628 nm característico de una PV. Los estudios genéticos realizados en el gen de la Protoporfirinógeno oxidada (PPOx) en esta familia han permitido detectar una mutación puntual (G749—A) en la última base del exón 5, sin cambio de aminoácido (E157—E) pero responsable de una mutación de splicing. Podemos concluir que GW presenta Porfiria Dual PCT/PV, mientras que su hermana MW, hasta el momento sólo ha manifestado la PV.

414. (3996) EVALUACION DE HDL COMO SUSTRATO DE LIPASA HEPATICA. ZAGO, VALERIA; BERG, GABRIELA; WIKINSKI, REGINA; SCHREIER, LAURA

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Depto. Bioquímica Clínica, Fac de Farmacia y Bioquímica, UBA

La hipertrigliceridemia cursa con disminución del colesterol-HDL asociado a una menor actividad de lipoproteína lipasa. Modificaciones en la estructura y composición de HDL influirían en la acción de lipasa hepática (LH) sobre esta lipoproteína. Objetivo: diseñar un ensayo que permita evaluar in vitro la calidad de HDL como sustrato de LH. De sueros de donantes normotriglicéridémicos (NTG)(n=5, TG<180 mg/dl) y de hipertriglicéridémicos (HTG)(n=5, TG>700 mg/dl, no diabéticos) se aisló HDL (d=1063-1210 mg/dl). Se obtuvo plasma post inyección de 60 UI heparina/kg peso de donante (PPH) como fuente de LH, actividad 24±2 μmol ácidos grasos (AG)/ml PPH.h. Se caracterizó HDL en todos sus componentes. Se incubaron distintas concentraciones de triglicéridos(TG)-HDL (0.10-0.25 mM) de NTG con PPH (entero y diluido ½ y ¼) en presencia de NaCl 1M como inhibidor de otras lipasas endoteliales y heparina (500 UI/ml) a 60 y 120 min. Se ensayó el agregado de albúmina bovina libre de AG (BSA), en concentración variable, para captar los AG liberados durante la incubación y evitar la saturación del sistema. Se ensayó a distintas temperaturas: 30° y 37° con buffer Tris HCl 0.01M, NaCl 0.15, a distintos pH= 9, 8 y 7.4. Los AG liberados se midieron por método colorimétrico, se descontó AG del PPH medidos como blanco y se calculó velocidad máxima y Km por Lineweaver-Burk. La selección de las condiciones fueron: TG-HDL: 0.15-0.23 mM, PPH dil ½, 30 mg/ml de BSA, pH 7,4 a 37 °C por 120 min. HDL de HTG vs NTG resultó rica en TG y pobre en colesterol (Media±ES): 10.9±1.0% vs 5.0±0.6, 13.5±1.8% vs 24.5±0.8, respectivamente, p<0.01. La aplicación del ensayo a HDL de HTG mostró que Km fue mayor respecto de NTG (184±43 μM vs 67±17, p<0.05) lo cual determina una menor afinidad entre sustrato y enzima.

415. (4036) ACTIVIDADES METABÓLICAS DE HDL EN UN NIÑO CON HIPERQUILOMICRONEMIA Y EN FAMILIARES CON DIFERENTES MUTACIONES EN EL GEN DE LA LIPOPROTEÍNA LIPASA. BRITES, FERNANDO¹; VERONA, JULIÁN¹; FERNÁNDEZ, KARINA¹; CÉSAR, MARTA²; CASTRO, GRACIELA³; WIKINSKI, REGINA¹

¹Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. ²Depto. de Nutrición, Hospital Gutiérrez. ³Instituto Pasteur de Lille, Francia.

La hiperquilomicronemia primaria es una hipertrigliceridemia severa acompañada por marcada disminución del colesterol-HDL (C-HDL) y atribuible a la deficiencia de lipoproteína lipasa (LPL). El objetivo de este trabajo fue evaluar distintas actividades metabólicas de HDL en un niño de 4 años con deficiencia de LPL debida a dos mutaciones (Ser447Stop y Arg170Leu) y en 11 miembros de su familia. Se evaluaron eflujo de colesterol de células de hepatoma de rata Fu5AH cargadas con 3H-colesterol y las actividades de lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP), paraoxonasa (PON) y acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF-AH). Al comparar al paciente con los portadores de mutaciones silentes o sin mutaciones (grupo control), se observó que el niño presentaba disminución significativa del eflujo de colesterol celular (Media±DE; test Z) (6,1 vs 11,1±2,5%/h.ml, P<0,001), actividad de LCAT conservada (20,5 vs 18,6±3,8%/h.ml, P>0,05) y aumento de la actividad de CETP (338 vs 227±45%/h.ml; P<0,001). Con respecto a las enzimas antioxidantes, PON estaba significativamente aumentada en el paciente en comparación al grupo control (139 vs 106±11 mmol/ml.min; P<0.0001), y PAF-AH disminuida (11,2 vs 19,0±5,1 mmol/ml.min; P<0,05). Los individuos que presentan alternativamente las mutaciones Ser447Stop o Arg170Leu no mostraron diferencias con respecto a los controles. La presencia de una mutación no sería suficiente para introducir modificaciones significativas en las funciones de HDL. A pesar de la marcada disminución de los niveles de HDL se podrían mantener ciertas actividades enzimáticas, lo cual podría sugerir una adaptación compensatoria frente a los cambios generados por la deficiencia de LPL sobre la HDL.

416. (4045) PERFIL PROOXIDANTE Y ANTIOXIDANTE EN SANGRE DE PACIENTES CON GLAUCOMA. FERREIRA, SANDRA; REPPETO, MARISA; LERNER, FABIAN; LLESUY, SUSANA

Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Las determinaciones de estrés oxidativo en sangre han demostrado ser útiles para establecer marcadores periféricos en distintas patologías. Como el glaucoma es una patología multifactorial y los mecanismos propuestos del daño neuronal incluye el estrés oxidativo, el objetivo del presente trabajo fue establecer la actividad de enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) quimioluminiscencia (QL) y capacidad antioxidante total (TRAP). Métodos: Se evaluaron 14 pacientes con glaucoma de ángulo abierto (POAG), 15 con glaucoma de pseudoexfoliación (GPEX) y 16 controles. SOD, (CAT) se evaluaron por espectrofotometría. QL y TRAP se midieron por técnicas de luminiscencia. Resultados: La actividad de SOD disminuyó en GPEX (0,37±0,05 U SOD/mg prot) comparada con los controles (0,7±0,2 U SOD/mg prot p< 0,01). La actividad de CAT fue 1,3±0,1 pmol/mg prot en GPEX p<0,001, 1,4±0,1 pmol/mg prot en POAG p<0,01 (VC 2,1±0,2 pmol/mg prot). Se observó un aumento de QL en pacientes con GPEX (353±25 cpm/mg Hb, p<0,001, VC 139±10 cpm/mg Hb). El TRAP para GPEX fue 250±17 μM Trolox (p<0,01), y con POAG 315±19 μM Trolox (p<0,05) (VC 338±15 μM). Conclusiones: El aumento significativo de las especies prooxidantes y la disminución de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos nos lleva a concluir que se podría determinar el perfil oxidativo como una herramienta más para el diagnóstico precoz de esta patología.

ENDOCRINOLOGIA Y REPRODUCCION X

417. (3228) ELEVADA EXPRESIÓN DE TGFβ1 Y AROMATASA (CYP19) EN TUMOR CALCIFICANTE DE CÉLULAS GRANDES DE SERTOLI (LCCSCT). SARACO, N; BERENSSTEIN, E; SCIARA, M; DAVILA, MTG; CIACCIO, M; BELGOROSKY, A; RIVAROLA, MA

Hospital de Pediatría "J.P.Garrahan", Buenos Aires

Se ha descrito al TGFβ como factor supresor de tumores. Sin embargo, en diversos tumores malignos se observó aumento de TGFβ1. No se ha reportado expresión de TGFβ1 en LCCSCT. En estudios previos en LCCSCT, observamos mayor abundancia del ARNm CYP19 en tejido testicular. Nuestro objetivo fue analizar en LCCSCT (paciente prepuberal con ginecomastia) el rol de TGFβ1 y estrógenos locales sobre el desarrollo tumoral. La muestra se dividió macroscópicamente en dos fracciones: tumoral (Tu) y extratumoral (ExTu). El examen microscópico mostró pérdida de la estructura testicular en Tu y presencia de algunas células tumorales en ExTu. Se evaluó: abundancia de ARNm CYP19 y TGFβ1 por RT-PCR semicuantitativa; expresión y citolocalización de TGFβ1 y aER (receptor de estrógenos) por inmunohistoquímica (% de células positivas); relación índices de proliferación y apoptótico (IP/IA), como parámetro de crecimiento celular, por Ki67 y TUNEL resp. En Tu la abundancia de ARNm TGFβ1 (1,37±0,12UA) y CYP19 (12,40±2,81UA) fue significativamente mayor que en ExTu (TGFβ1: 0,59±0,05UA; CYP19: 1,82±1,26UA) p<0,05. Como ocurre en el testículo normal, el TGFβ1 no se observó en células de Sertoli (CS) ExTu, pero sí en CSTu. Una señal muy intensa se detectó en células intersticiales (CI) Tu. Se localizó el aER en CSTu (65%) con mayor intensidad que en CS ExTu (25%) y en CI Tu (4,8%) pero no en CI ExTu. En Tu IP/IA fue mayor en CS (IP/IA: 4,28) y en CI (IP:10 IA:0) con respecto a ExTu (CS:IP/IA: 0,86; CI:IP/IA: 0,69). La mayor abundancia de TGFβ1, CYP19 y aER y el elevado índice de crecimiento celular en Tu, sugiere que TGFβ1 y los estrógenos locales jugarían un rol importante en el crecimiento tumoral. Los estrógenos producidos por las células Tu estimularían la producción de TGFβ1 en CI y en CS Tu. Además, la falta de respuesta al TGFβ1 (factor

antiproliferativo y proapoptótico) evidenciada en Tu, favorecería la proliferación tumoral. Finalmente, la expresión de TGFB1 y CYP19 podrían servir como marcadores pronósticos del LCCSCT.

418. (3453) GLUTATIÓN, GLUTATIÓN REDUCTASA Y GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA EN CÉLULAS DE SERTOLI; REGULACIÓN POR FSH Y FGF. MAZZONE, GRACIELA LUJAN; SCHTEINGART, HELENA F.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez

La célula de Sertoli (CS) se encuentra bajo el control de FSH, andrógenos y factores de crecimiento (FC) de producción local. Hemos demostrado en CS que el glutatión (GSH) y las actividades de las enzimas gamma-glutamil transpeptidasa y glutatión-S-transferasa (GST) son reguladas diferencialmente por hormonas y FC. El objetivo de este trabajo fue analizar si existe relación entre los niveles de GSH y las actividades de las enzimas glutatión reductasa (GR) y GST bajo tratamiento con FSH y/o FGF básico (FGF). CS de ratas macho de 20 días de edad fueron cultivadas por 24, 48 y 72h con FSH (100 ng/ml) y/o FGF (10 ng/ml). Se determinaron los niveles intracelulares de GSH y las actividades de las enzimas GR y GST. La expresión de GR se determinó por Western blot. Los niveles de GSH aumentaron significativamente en tratamientos con FSH por 24 y 48h (BA: 135.2±14.6; FSH 24h: 241.1±15.8*; 48h:199.6±7.5*; 72h: 143.6±4.4 pmol/µgADN, X±SD, n=6, *p<0.05 vs. BA) y con FGF en todos los tiempos estudiados (FGF 24h: 164.5±5.3*; 48h: 218.1±6.6*; 72h: 271.4± 9.4*). Se observó un efecto potenciador de FSH sobre FGF a las 72h (FSH+FGF 24h: 332.6±20.3*#; 48h: 279.6±5.3*#; 72h: 341.2±10.4*#, #p<0.05 vs. FGF). La actividad de GR aumentó por tratamiento durante 72h con FGF y/o FSH+FGF (BA: 0.21±0.04; FSH: 0.23±0.05, FGF: 0.32±0.08*; FSH+FGF: 0.34±0.04* nmoles/µgADN, X±SD, n=6, *p<0.05). El análisis por Western blot reveló un aumento de GR con FSH y FSH+FGF. La actividad de GST aumentó significativamente por tratamiento con FSH durante 48 y 72h. FGF no estimuló la GST en los tiempos y dosis ensayados. Los resultados obtenidos sugieren que la homeostasis de GSH en la CS está regulada por FGF y FSH. Estas hormonas actúan diferencialmente sobre el reciclado (GR) y la conjugación (GST) del GSH.

419. (3540) SINTESIS TESTICULAR DE MELATONINA, PRESENCIA DE RECEPTORES GONADALES MEL[1A] Y SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANDROGENOS EN EL HAMSTER DORADO. FRUNGIERI, MONICA BEATRIZ; GONZALEZ-CALVAR, SILVIA I; ZITTA, KARINA; PIGNATARO, OMAR P; MAYERHOFER, ARTUR; CALANDRA, RICARDO S

Instituto de Biología y Medicina Experimental Facultad de Medicina, UBA; Anatomical Institute, LMU Munich, Alemania; Facultad Cs Exactas, UNLP

La melatonina (MT) actúa sobre el eje hipotálamo-hipofisario y regula la función reproductiva en mamíferos con reproducción estacional. Datos previos de nuestro laboratorio y otros grupos de trabajo, señalan un rol inhibitorio de la MT sobre la producción de testosterona (T). El objetivo de este trabajo fue evaluar el sistema melatoninérgico testicular en el hámster (Syrian) Dorado adulto activo y foto-regresionado. A tal fin se estudió: 1) la síntesis testicular de MT, 2) la presencia de receptores de MT en células de Leydig por técnicas de biología molecular, 3) el rol de MT sobre la producción in vitro de cAMP y andrógenos, y 4) la acción de MT sobre la expresión génica de StAR y enzimas esteroidogénicas. Por RT-PCR se detectó la expresión de serotonina N-acetiltransferasa, enzima clave en la síntesis de MT, en células de Leydig. También por RT-PCR y Western blot, se determinó la existencia de receptores mel[1a] en dichas células, pero no de receptores mel[1b]. La presencia de MT (10(-6)M) en el medio de incubación, inhibió en un 29% y 64% la producción post-hCG de cAMP en células de Leydig de animales activos y regresionados, respectivamente (p<0.05). MT disminuyó en un 38% la producción post-hCG de T en hámsteres activos (p<0.05); mientras que, inhibió en un 42% la producción de

3alfa-Diol en hámsteres regresionados (p<0.05). MT produjo también una marcada inhibición en la expresión de StAR, y de las enzimas citocromo p450scc, 3beta-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa y 17beta-deshidrogenasa. En resumen, nuestros resultados muestran que MT es un importante regulador local de la producción de andrógenos en el hámster mediante su interacción con receptores mel[1a] ubicados en las células de Leydig, y la inhibición en la expresión génica de la StAR y enzimas esteroidogénicas claves.

420. (3608) EFECTO REGULADOR DE LA GALECTINA-1 (GAL-1) SOBRE LA LÍNEA TUMORAL DE CÉLULAS DE LEYDIG MA-10. BIRON, VERÓNICA ANDREA; PATRIGNANI, ZORAIDA; PIGNATARO, OMAR; IGLESIAS, MARÍA MERCEDES

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA IByME-CONICET, Buenos Aires

La Gal-1 es una proteína con afinidad por beta-galactósidos, con propiedades inmunomodulatorias, antiinflamatorias y antimetastásicas, presente en células normales y tumorales. Hemos demostrado la inducción de apoptosis causada por Gal-1 en cultivos primarios de células de Leydig. Objetivo: Ya que las células malignas son más resistentes a la apoptosis, se investigó el efecto regulador de Gal-1 sobre la línea tumoral de Leydig MA-10. Métodos y Resultados: Las células se incubaron en ausencia o presencia de Gal-1, sin o con hCG o dbAMPc x 5 h, y se midió la producción de progesterona (Pg) por RIA. La Gal-1 (14 µM) disminuyó la Pg basal y la estimulada por hCG o dbAMPc (60, 55 y 33%, respectivamente). Paralelamente, la viabilidad celular disminuyó al 70 % con Gal-1 (control positivo de apoptosis: genisteína (G)+metilprednisolona (MP) dio 63%). Los efectos causados por Gal-1 se debieron a la inducción de apoptosis, demostrada por el ensayo de hipodiploidía del ADN, y por la fragmentación del ADN. Los datos obtenidos mostraron un 26.6 y 32.4% de ADN hipodiploide de las células expuestas a la Gal-1 durante 24 h (7 y 14 µM, respectivamente); mientras que el control mostró un 13.9%. La apoptosis causada por Gal-1 fue revertida en presencia de su ligando específico, lactosa 100 mM (15 y 17%). En todos los casos estudiados las diferencias fueron significativas (p< 0.01). Conclusión: Gal-1 inhibió la esteroidogénesis basal y estimulada por gonadotrofinas o dbAMPc en las células MA-10. Dicha inhibición se correlacionó con una disminución del crecimiento celular. Este efecto inhibitorio se debió a la inducción de apoptosis causado por Gal-1, resultando ser estas células tumorales también susceptibles a la acción de la lectina en concentraciones similares a las células normales.

421. (3900) ACTIVACIÓN DE GENES EMBRIONARIOS EN UN TUMOR DE OVARIO DE RATONES TRANSGÉNICOS CON SOBREEXPRESIÓN DE LA HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA (HCG). RULLI, SUSANA; AHTIAINEN, PETTERI; POUTANEN, MATTI; HUHTANIEMI, ILPO

Instituto de Biología y Medicina Experimental Dept. of Physiology, Univ. Turku, Finlandia

Hemos descrito un modelo de ratones transgénicos con sobreexpresión crónica y elevada de la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG), que desarrolla tumores de ovario de tipo teratoma (SAIC 2002). El objetivo del presente trabajo fue analizar las etapas iniciales de desarrollo del tumor, y su correlación con la activación de genes embrionarios. Estos tumores se manifiestan a temprana edad (entre las seis y ocho semanas) y surgen de la activación espontánea de ovocitos presentes en el ovario, dando origen a tejidos derivados de las tres capas embrionarias, endodermo, mesodermo y ectodermo. Se identificó en el ovario de ratones transgénicos, la aparición progresiva de células gigantes de tipo trofoblásticas en áreas del cuerpo lúteo, caracterizadas por núcleos grandes (técnicas histológicas; tinción nuclear fluorescente DAPI), y la formación de una diversión

dad de tejidos de tipo embrionario, y posteriormente de tipo maduro. Se demostró por técnicas de inmunohistoquímica y expresión génica por RT-PCR, la presencia de marcadores específicos de células trofoblásticas: proliferina, lactógeno placentario (PL)-1 y PL-2, y de alfa-fetoproteína, gen específico del endodermo primitivo, en muestras de tumores de ovario. La localización por inmunohistoquímica del factor transcripcional oct-4 (pou5f1) demostró la existencia de células madres indiferenciadas, normalmente provenientes de la masa celular interna de blastocistos. Estos resultados demuestran que la secreción excesiva y crónica de hCG induciría la diferenciación de distintos tipos celulares y activación de genes del desarrollo embrionario, y sugieren un nuevo rol de la hCG, no sólo en la tumorigénesis ovárica, sino también en la proliferación y diferenciación de tejidos embrionarios y extraembrionarios.

422. (3907) LA HIPERSECRECIÓN CRÓNICA DE LA HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA (HCG) EN RATONES TRANSGÉNICOS CAUSA INFERTILIDAD Y ALTERACIONES EN LOS ÓRGANOS REPRODUCTIVOS MASCULINOS. RULLI, SUSANA; AHTIAINEN, PETTERI; MAKELA, SARI; TOPPARI, JORMA; POUTANEN, MATTI; HUHTANIEMI, ILPO

Instituto de Biología y Medicina Experimental Dept. of Physiology, University of Turku, Turku, Finlandia

Con el propósito de estudiar la influencia de la secreción crónica y excesiva de hCG sobre la función reproductiva en el macho, se desarrollaron dos modelos de ratones transgénicos: a) ratones hCG β +, que expresan hCG β con moderados niveles de hCG/LH bioactiva (4 veces mayor); b) ratones hCG+, que expresan hCG β y hCGalfa con niveles de hCG/LH bioactiva 2000 veces mayor que los controles. Mientras que los machos hCG β + presentan una fertilidad normal, los hCG+ son infértiles, primariamente debido a una inhabilidad de copular. A los seis meses de edad, ambos modelos presentaron un peso testicular menor comparados a los controles (C: 91 \pm 6; hCG β +: 68 \pm 2*; hCG+: 46 \pm 4* mg, *p<0.01), menores niveles de FSH sérica (C: 60 \pm 3; hCG β +: 23 \pm 5*; hCG+: 2 \pm 0.5* ng/ml), *p<0.01), y concentraciones intratesticulares de testosterona (C: 2.5 \pm 0.4; hCG β +: 2.3 \pm 0.4; hCG+: 32.8 \pm 4.0* ng/mg proteína, *p<0.01) y progesterona (C: 0.13 \pm 0.02; hCG β +: 0.22 \pm 0.02; hCG+: 1.36 \pm 0.28* nmol/mg proteína, *p<0.01) significativamente aumentadas. Exámen histológico de los testículos de hCG+ revelaron hipertrofia/hiperplasia de las células de Leydig. La mayoría de los túbulos seminíferos presentaron espermatogénesis completa, aunque una progresiva degeneración de los mismos a edades avanzadas. Se observó una obstrucción funcional de la uretra por distensión y acumulación de espermatozoos en el vas deferens distal, así como dilatación de la vejiga urinaria y agrandamiento de próstata y vesículas seminales. Este modelo transgénico provee evidencias in vivo de la acción crónica y elevada de hCG, que afectaría severamente la función reproductiva en el macho en múltiples órganos, causando infertilidad.

423. (3941) EXPRESIÓN DE IGF1 Y DEL RECEPTOR DE IGFs TIPO 1 EN EL TESTÍCULO PREPUBERAL HUMANO: IMPLICANCIA DEL EJE GH/IGFS EN EL INTERSTICIO TESTICULAR. SCIARA, MARIELA INÉS; BERENSHTEIN, E; SARACO, N; RIVAROLA, MA; BELGOROSKY, A

Hospital de Pediatría Garrahan

Se ha postulado al IGF1 como estimulador parácrino o autócrino de la célula de Leydig. Ratones adultos homocigotas para la mutación del gen de IGF1 son infértiles, con el volumen testicular disminuido. En el testículo humano adulto se han inmunolocalizado el IGF1 y el receptor de IGFs tipo 1 (IGF1R) en células de Sertoli, espermatozoos y células de Leydig. La información disponible en testículo humano prepúber es limitada. El sistema IGF1/IGF1R es inhibidor de la apoptosis celular en varios tejidos. Hemos reportado el efecto antiapoptótico del IGF1

sobre las células testiculares prepuberales en cultivo (SAIC 2002). El objetivo fue analizar la inmunolocalización del IGF1 y IGF1R en tejido testicular prepuberal humano. Tejidos provenientes de necropsias se dividieron en tres grupos de edad (G): G1, neonatos, 1-21 días de edad; G2, lactantes, 1-6 meses y G3, prepúberes, 1-6 años. Por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos se localizó el IGF1 y IGF1R sobre cortes de tejido, expresándose los resultados como porcentaje de células positivas (X \pm SD). El IGF1 se localizó en células intersticiales (CI): 3.61 \pm 2.12; 4.6 \pm 2.91; 5.02 \pm 4.3; germinales (CG): 5.34 \pm 5.7; 4.84 \pm 5.4; 6.04 \pm 4.4 y pre Sertoli (CS): 0.89 \pm 0.99; 0.77 \pm 1.1; 2.14 \pm 1.41 en G1(n=13), G2(n=13), G3(n=10), respectivamente. No hubo variación significativa en la expresión de IGF1 entre los tres G, en ningún tipo celular. El IGF1R se detectó en CI: 11.33 \pm 4.72; 5.27 \pm 3.38; 1.75 \pm 1.37; en CG: 9.33 \pm 6.76; 10.5 \pm 7.5; 11.7 \pm 9.28 y en CS: 0.88 \pm 0.84; 1.03 \pm 0.84; 0.91 \pm 1.44 en G1(n=8), G2(n=9), G3(n=11), respectivamente. La expresión de IGF1R en CI del G1 fue significativamente mayor que en G2 y G3 (Kruskal Wallis, p<0.05). La expresión en CG y CS no varió con la edad. La alta expresión del IGF1R en el compartimento intersticial en el período neonatal sugeriría que el sistema GH/IGFs podría estar involucrado en la inhibición de la apoptosis y diferenciación de células intersticiales con capacidad esteroideogénica.

ONCOLOGÍA V

424. (3392) EVALUACION DE LA FAGOCITOSIS EN MACROFAGOS PERITONEALES DE RATONES PORTADORES DE UN TUMOR EXPERIMENTAL. LAGUENS, GRACIELA; CORONATO, SILVIA; PONZINIBBIO, CARLOS; DI GIROLAMO, WANDA

Cátedra de PATOLOGIA B Fac.C. Médicas UNLP

A pesar de la presencia de antígenos en las células tumorales no se desarrolla una respuesta inmune que evite la progresión del tumor. Las células presentadoras de antígenos, macrófagos, células dendríticas, que son las más comprometidas en este proceso, se encuentran inhibidas por diversos factores provenientes del mismo tumor o del huésped portador. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la capacidad fagocítica de macrófagos (Mo) peritoneales provenientes de ratones portadores de tumor y de controles sanos. Ratones BALB-c (n=20), fueron inoculados por vía subcutánea con 10(6) células de un fibrosarcoma inducido por Metilcolantreno. A los 7, 15 y 21 días post-inoculación se extrajeron macrófagos peritoneales sin activar previamente. A las 24 hs se realizó un co-cultivo de 4 horas con *Candida albicans* inactivadas. Como controles se utilizaron macrófagos peritoneales de ratones sanos BALB-c (n=21). Resultados: en los macrófagos provenientes de ratones con tumor, el índice de fagocitosis (IF) (2.3 candida/Mo) fue significativamente menor (p<0.02) respecto a los controles (3.4 candida por Mo). Por otra parte, el IF muy disminuido en los primeros días de la inoculación (1.8), se fue incrementando a lo largo de la progresión tumoral hasta alcanzar valores similares a los controles (3.4), para disminuir en los últimos estadios (1.9). Estos resultados, sugieren que en la progresión tumoral, las funciones de reconocimiento e internalización en los macrófagos son procesos dinámicos, que sufren modificaciones previas a su participación en la respuesta inmune antitumoral tendientes a provocar condiciones en el huésped que facilitan el crecimiento tumoral.

425. (3405) DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MUPP-1 EN ADENOCARCINOMAS DE MAMA MURINOS INDUCIDOS POR EL VIRUS POLIOMA. LICANDRO ALCÁNTARA, MARÍA LAURA; JANG, HYE SUN; SANJUAN, NORBERTO

Facultad de Medicina (UBA) Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina (UBA).

Los virus Polioma pueden inducir neoplasias en 14 tejidos distintos luego de su inoculación en ratones neonatos. Los mecanismos por los cuales Polioma induce neoplasias dependen de la interacción del oncogén viral mT con diversos reguladores celulares críticos. El análisis de las secuencias peptídicas indica que Polioma tiene múltiples dominios S/T-X-V/I/L ubicados en sus antígenos mT, LT, sT y VP-1. Estos consensos pueden combinarse con los dominios PDZ de las proteínas MAGUK, que son un conjunto de péptidos ubicados en la membrana plasmática e involucrados en la transmisión de señales. El objetivo de este trabajo fue determinar si la inducción de adenocarcinomas de mama en ratones por Polioma cambia los patrones de expresión de MUPP-1, un péptido perteneciente a las proteínas MAGUK. Se inocularon ratones neonatos C3H BiDa con la cepa A2 de Polioma y se sacrificaron grupos de animales a los días 10 y 40 post-infección (pi) y cuando las neoplasias fueron evidentes clínicamente. Se diseccionaron las glándulas mamarias y algunas fueron procesadas histológicamente mientras que otras fueron congeladas. Igual procedimiento se realizó con glándulas mamarias normales. En los cortes histológicos se realizó inmunomarcación contra MUPP-1 y contra VP-1 de Polioma por inmunoperoxidasa, y con los tejidos congelados se prepararon homogenatos en los que se detectaron los mismos antígenos por dot-blot. Se observó que la mama normal expresa niveles bajos de MUPP-1. Esos niveles aumentan a medida que progresa la infección viral pero, en los adenocarcinomas vuelven a ser muy bajos. La ubicación de MUPP-1 en las mamas normales es en el epitelio ductal. Se concluye que en las neoplasias de mama inducidas por Polioma la expresión de MUPP-1 está muy disminuída. Este resultado es similar a lo que ocurre por la interacción del antígeno E6 del virus Papiloma Humano con MUPP-1 a la que degrada a través del proteasoma. Es posible, entonces, que alguno de los genes de Polioma degrade MUPP-1 de igual modo.

- 426. (3464) DISMINUCIÓN EN LA EXPRESION DE MOLECULAS COESTIMULADORAS EN CELULAS DENDRÍTICAS DE GANGLIOS QUE DRENAN TUMORES MALIGNOS HUMANOS.** DI GIROLAMO, WANDA; CORONATO, SILVIA; LAGUENS, RUBÉN; LAGUENS, GRACIELA

Cátedra de Patología B. Facultad de Cs.Médicas UNLP

Las Células Dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígenos más eficientes. Las CD que infiltran tumores son capaces de captar antígenos tumorales y transportarlos a los ganglios linfáticos regionales (GLR). Sin embargo, en ellos no se desarrolla una respuesta inmune antitumoral eficaz. Esta respuesta deficitaria podría deberse a la falta de maduración de las CD o al déficit en la expresión de moléculas coestimuladoras B7 (CD80, CD86). La reorganización del citoesqueleto y la formación de dendritas dependen de la proteína P55 llamada fascina y constituyen un paso crítico en la maduración de las CD. En un trabajo anterior demostramos que los GLR que drenan tumores malignos humanos presentan una marcada depleción de CD con respecto a los ganglios controles. El objetivo del presente trabajo es evaluar la maduración de las CD de los GLR de diferentes tumores epiteliales malignos humanos. Sobre cortes de criostato de GLR (n=18) se realizaron técnicas de IHQ con anticuerpos monoclonales anti-fascina y anti-CD86. El recuento de células inmunomarcadas se realizó por medio de un análisis morfométrico computarizado. Se obtuvieron los siguientes resultados: 5.506 células fascina+/mm², 3.292 células CD86+/mm². El 40% de CD fascina+ (morfológicamente maduras) no expresan CD86, molécula coestimuladora indispensable para la presentación antigénica. Este hecho podría ser uno de los mecanismos de evasión del tumor al reconocimiento inmune.

- 427. (3477) EFECTO DE LA APLICACIÓN INTRATUMORAL DE CELULAS DENDRÍTICAS DOBLEMENTE ESTIMULADAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN FIBROSARCOMA EX-**

PERIMENTAL EN UN MODELO MURINO. CORONATO, SILVIA; DI GIROLAMO, WANDA; LAGUENS, GRACIELA; PONZINIBBIO, CARLOS

Cátedra de Patología B. Facultad de Cs.Médicas UNLP

Las células dendríticas (CD), tienen la capacidad de aumentar la eficiencia de una respuesta inmune antitumoral cuando son específicamente armadas con antígenos tumorales. Con el fin de explorar este efecto se diseñó el siguiente experimento: Ratones BALB-c machos de 60- 90 días fueron desafiados *in vitro* con 10⁶ células tumorales de un fibrosarcoma experimental inducido por metilcolantreno. Cuando el tumor se hizo macroscópicamente visible se les extrajo el bazo. A partir del mismo se aislaron células dendríticas por doble adherencia, que se cultivaron *in vitro* con GM-CSF e IL-4 por 72 hs. Luego se co-cultivaron por 24 hs con células tumorales del mismo origen. Como controles se obtuvieron células dendríticas provenientes de ratones sanos. Al finalizar el tiempo de cultivo, las células se inyectaron por vía intratumoral a 3 lotes de 6 ratones de la misma cepa con tumor en crecimiento que habían sido inoculados 7 días antes con 10⁶ células tumorales del mismo fibrosarcoma. Como control puro, a un lote adicional de ratones con tumor en crecimiento se les inoculó PBS. A los 8 días los animales se sacrificaron y se pesó el tumor. Los resultados expresan el peso promedio del tumor del total de los 3 lotes. A) Ratones inoculados con PBS: 1.43 grs ± 0.43. B) Ratones inoculados con CD provenientes de bazo de ratones sanos 0.93 grs ± 0.35 y C) Ratones inoculados con CD provenientes de bazos de ratones portadores de tumor 0.57 grs ± 0.36. Estos resultados indican que las CD provenientes de bazos de ratones portadores de tumor disminuyen significativamente el tamaño tumoral (C vs A: p < 0.01), demostrando el potencial terapéutico del doble estímulo en las CD para obtener un efecto antitumoral.

- 428. (3544) EFECTO DELETÉREO SOBRE EL ORGANISMO INDUCIDO POR FENÓMENOS INFLAMATORIOS ASOCIADOS AL CRECIMIENTO DE UN TUMOR MURINO.** JENSEN, FEDERICO; BUSTUOABAD, OSCAR; RUGGIERO, RAÚL; MEISS, ROBERTO

ILEX-(CONICET) División Medicina Experimental, IIHema e IEO Acad. Nac. Med. de Buenos Aires

Existe evidencia de que en sitios de inflamación crónica la probabilidad de que aparezca un tumor maligno está significativamente aumentada. En este trabajo, indagamos la proposición recíproca, es decir, en qué medida el crecimiento de un tumor puede inducir fenómenos inflamatorios y cuál es la contribución de éstos en el efecto deletéreo ejercido por el tumor sobre el organismo. Utilizamos como modelo de estudio el fibrosarcoma de ratón MC-C. Se inocularon 1x10⁵ células MC-C en 18 ratones BALB/c. A distintos tiempos post-inoculación se observó que el número de neutrófilos (media ± DS) iba en aumento: día 0: 2553 ± 384; día 25: 4958 ± 1584; día 30: 8494 ± 3904; día 40: 16744 ± 2286 (p<0,001); día 45: 22767 ± 8112 (p<0,001). También se observó un aumento de la concentración de TNF- alfa (media ± ES) desde 13 ± 3 UL50/ml (control) a 40 ± 5 UL50/ml día 35 (p< 0,05) y 64 ± UL50/ml día 45 (p<0,001). Los aumentos tanto de neutrófilos como de TNF-alfa son indicadores de una respuesta inflamatoria sistémica. Los principales daños histológicos observados en el organismo del ratón portador de MC-C fueron: a) hígado con degeneración grasa masiva, hiperplasia de células de Kupffer e infiltrado leucocitario perivascular y sinusoidal; b) riñón con glomerulopatía proliferativa, trombosis capilar y necrosis tubular y c) bazo con marcada hiperplasia folicular y medular. El tumor mostró un aumento progresivo del área necrótica con infiltración leucocitaria peri e intratumoral. En conclusión el proceso inflamatorio sistémico asociado al crecimiento del tumor MC-C parece responsable, al menos en parte del efecto patológico que aquel produce. En conclusión el proceso inflamatorio sistémico asociado al crecimiento del tu-

mor MC-C parece responsable, al menos en parte del efecto patológico que aquel produce.

429. (3650) EL ROL DE LOS RECEPTORES ACTIVADORES DE LA PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS GAMMA (PPARG) SOBRE LA VIABILIDAD Y LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS TUMORALES E INFLAMATORIAS MURINAS. MAGENTA, GABRIELA; MILEI, JOSE; JASNIS, M ADELA

Instituto de Oncología A Roffo, UBA. Instituto de Investigaciones Cardiológicas Dr. A Taquini

Los PPARg están involucrados en procesos inflamatorios y en inhibición del crecimiento tumoral. La prostaglandina J2 (PGJ2) es el agonista natural y las tiazolidinedionas (hipoglucemiantes) son agonistas sintéticos. Estudiamos el efecto del hipoglucemiante rosiglitazona (Ro) y de PGJ2 sobre producción de óxido nítrico (NO) y actividad metabólica (AM) de células tumorales LMM3, macrófagos murinos normales (MfN) y de portadores de tumor LMM3 (MfT). Se cultivan las células por triplicado en placas de 96 hoyos en estufa gaseada con Ro (0.1-100uM) o PGJ2 (0.01-100uM) estimuladas o no con LPS/IFN γ (1ng/ml y 100UI/ml respectivamente). A las 24 hs se determina niveles de NO con reactivo de Griess y AM (= viabilidad celular) por ensayo MTS. Resultados. Células LMM3 a) +Ro: disminuye producción de NO y AM (25 y 40% respectivamente p<0.001); +Ro/LPS/IFN: aumenta NO (30-112% p<0.001) y disminuye AM (20% p<0.05), vs LPS/IFN; c) +PGJ2: disminuye NO (30% p<0.05) sin variar AM; d) +PGJ2/LPS/IFN: no varía NO ni AM, vs LPS/IFN. MfN a)+Ro: no varía NO y disminuye AM (10-33% p<0.001); +Ro/LPS/IFN: disminuye el NO (20-30% p<0.01) y aumenta AM (6-17% p<0.01), vs LPS/IFN; c)+PGJ2: aumenta AM (22% p<0.05) y disminuye el NO (10-20% p<0.01); d)+PGJ2/LPS/IFN: no varía AM y aumenta el NO (35-68% p<0.01), vs LPS/IFN. MfT a)+Ro: disminuye el NO (70% p<0.001) y aumenta AM (20% p<0.001); b)+Ro/LPS/IFN: aumenta el NO (40-190% p<0.001) sin variar AM, vs LPS/IFN; c)+PGJ2: disminuye el NO (13-40% p<0.001) sin variar AM; d)+PGJ2/LPS/IFN: no varía AM ni niveles de NO salvo con PGJ2 100uM que aumenta producción NO (37%) y AM (14%) p<0.05, vs LPS/IFN. Conclusiones. El efecto de la activación de PPARg sobre la AM y producción de NO depende del ligando, tipo celular, estado de activación y estímulo proporcionado

430. (3745) EFECTO DEL TRATAMIENTO CON NEURAMINIDASA SOBRE LA EXPRESIÓN DE MUCINA TIPO 1 (MUC1) Y ANTÍGENOS ASOCIADOS EN TUMORES DE CABEZA Y CUELLO. CROCE, VIRGINIA; RABASSA, MARTÍN; CALIFANO, LEONARDO; VOOGD, ANA; SEGAL-EIRAS, AMADA

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas Instituto de Oncología "Angel H. Roffo", UBA Buenos Aires, Argentina

Se estudió el efecto de la extracción de ácido siálico sobre la expresión antigénica de epitopes proteicos e hidrocarbonados de MUC1 en tumores epiteliales de cabeza y cuello utilizando inmunohistoquímica, SDS-PAGE y Western Blot. Se analizaron 27 muestras de pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Las muestras estudiadas por inmunohistoquímica fueron tratadas con neuraminidasa tipo V de *C. perfringens* (SIGMA, USA) en buffer acetato 0.1 U/ml, pH 5.5 durante 2 horas y a 37 °C. Por otra parte, se obtuvieron fracciones subcelulares que se analizaron mediante SDS-PAGE y Western Blot y fueron tratadas previamente a la siembra en el gel con neuraminidasa en buffer acetato 0.1 U/ml, pH 5.5 durante 2 horas y a 37 °C. Se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales: C595, contra el centro proteico de MUC1 y anti Tn y anti-sialil Tn, dirigidos contra haptenos hidrocarbonados. Mediante inmunohistoquímica con C595, se halló reacción positiva en 18 de 27 (67%) muestras; el hapteno sialil Tn, fue detectado en 2/27 (4%) muestras mientras que Tn no

se detectó en ninguna (0/27). Las muestras tratadas con neuraminidasa fueron positivas en 26 de 27 (96%) para C595, 6 de 27 (22%) con anti-Tn y 0 de 27 (0%) con anti-sialilTn. En los ensayos de SDS-PAGE y Western Blot se detectó MUC1 mediante C595 en todas las muestras (100%), anti-Tn fue positivo en 25 de 27 (92%) y anti-sialil Tn en 23 de 27 (85%); si bien el tratamiento con neuraminidasa no alteró el total general de casos positivos pudo constatar una disminución significativa de la expresión de una doble banda de 140 y 150 kD en las fracciones de membranas extranucleares. Conclusión: el tratamiento con neuraminidasa expone el centro antigénico de MUC1 previamente no detectable si bien disminuye la expresión de una de sus glicofomas que expresa sialil Tn.

431. (3840) CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA Y CITOGÉNICA DE DOS NUEVAS LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO: IAF-MEL-GRYN Y IAF-MEL-SAR. VALDEZ, RITA; LEVY, ESTRELLA M; LONGHI, MARÍA PAULA; BRAVO, ALICIA INÉS; SLAVUTSKY, IRMA; PEDRAZZINI, ESTELA; BARRIO, MARÍA MARCELA; MORDOH, JOSÉ

CIO-FUCA, Htal. Eva Perón, Acad. Nac de Medicina, Fund. Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina

Se establecieron dos nuevas líneas celulares a partir de la disgregación de metástasis ganglionares de melanoma humano, denominadas IAF-MEL-GRYN y IAF-MEL-SAR, respectivamente. Ambas se mantuvieron en cultivo continuo por un año. IAF-MEL-GRYN crece como monocapa, siendo las células ahusadas y desprovistas de melanina, mientras que IAF-MEL-SAR crece en monocapa con morfología estrellada y presenta células redondeadas en suspensión, con abundante melanina. Dichas líneas celulares fueron caracterizadas usando métodos inmunocitoquímicos, citogenéticos y moleculares. El análisis inmunocitoquímico reveló expresión de gp100, S100 y vimentina en ambas líneas, resultando negativas para queratina. Por inmunofluorescencia se determinó que ambas líneas celulares expresan los gangliosidos GD2 y GD3 así como HLA clase I. IAF-MEL-GRYN presentó además expresión de HLA clase II. Se analizó por RT-PCR la expresión de varios antígenos de diferenciación asociados a melanoma. Ambas líneas celulares expresan gp100, MAGE-1 y tirosinasa. MART-1 solo fue detectado en IAF-MEL-SAR. Se analizó también la expresión de los genes supresores de tumor p53 y p16. Se efectuó el estudio citogenético de IAF-MEL-GRYN con técnica de bandejo G. Se observó el siguiente cariotipo: 57-58 (número modal), X, del(1)(p22), +3, del(4)(q21), +7, +del(7)(q32), +8, +9, +11, +add(11)(p15), +del(11)(q21), +12, +i(14)(q10), +15, +16, +del(17)(p11), +19, +20, +22 [cp12]. IAF-MEL-GRYN desarrolló tumor al ser trasplantada en ratones nude. Estas nuevas líneas celulares proporcionan una potencial fuente de nuevos antígenos y modelos útiles para el estudio de la biología del melanoma.

432. (3872) EFECTO ANTITUMORAL DE UNA CEPA VACUNAL DE SALMONELLA TYPHI ATENUADA INOCULADA POR VÍA DE MUCOSAS. GRAVISACO, MARÍA JOSÉ; PETRILLO, EZEQUIEL; PASETTI, MARCELA; RUYBAL, PAULA; CROCI, MÁXIMO; MONGINI, CLAUDIA; WALDNER, CLAUDIA

CEFVBO (CONICET) Center for Vaccine Development, University of Maryland, Baltimore, USA. Instituto de Inmunooncología - Bs. As.

La asociación entre infección bacteriana y regresión tumoral en humanos ha sido documentada desde principios del siglo pasado. La *Salmonella* es un patógeno intracelular facultativo, que puede crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, ya sea en áreas hipóxicas y/o necróticas, como ocurre en muchos tumores y también en condiciones de buena oxigenación, permitiéndole colonizar tumores grandes así como también lesiones metastásicas pequeñas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto antitumoral de una cepa vacunal de *Salmonella Typhi*

atenuada inoculada por vía intranasal en ratones portadores de un tumor. Ratones BALB/c fueron inoculados por vía subcutánea con 1×10^6 células LBC (linfoma T murino). Cuando los animales mostraron tumores con un diámetro comprendido entre 0.7-1.2 cm, se les inoculó 2×10^9 UFC de las bacterias atenuadas (cepa CVD 915, Salmonella enterica serovar Typhi mutante deltaguaBA por vía intranasal o PBS (control). Se midió el tamaño del tumor presente en cada animal y se determinó la curva de supervivencia para cada lote experimental. Los ratones tratados con Salmonella mostraron un retraso en el crecimiento tumoral y un aumento significativo en la supervivencia (Tiempo medio de supervivencia, TM50, 33 días) comparados con el grupo control (TM50: 26 días). Aún más, el 23 % de los casos, presentó una regresión del tumor (n=40). Se demostró que esta cepa vacunal de Salmonella atenuada cuando es administrada por vía intranasal induce un claro efecto antitumoral. El incremento en la supervivencia de los ratones inmunizados podría deberse a la inmunidad innata y/o respuesta inflamatoria inducida por la presencia de la bacteria.

433. (3875) ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN, EL INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES (PMN) Y LA DISEMINACIÓN TUMORAL. REMEDI, MARIA MONICA; DONADIO, ANA C.; FREDE, SILVIA; BONACCI, GUSTAVO; CHIABRANDO, GUSTAVO

Dpto. Bioquímica Clínica. Fac. Cs. Químicas, UNC

Durante la cascada metastásica, las células tumorales interaccionan con células del huésped, matriz extracelular y membrana basal mediante moléculas de adhesión. La modificación en la expresión de estas moléculas facilitaría la diseminación neoplásica. Los mecanismos que median la modificación de dichas moléculas no están aún dilucidados. En un modelo experimental de tumor desarrollado en nuestro laboratorio se describió la disminución de la expresión de ICAM y uPAR en tumores in vivo, la infiltración de PMN y la presencia simultánea de metástasis en hígado y bazo. En el presente trabajo nuestro objetivo fue evaluar la modulación de la expresión de las moléculas de adhesión ICAM, uPAR y N-cadherina en cultivos celulares en relación con mediadores liberados por PMN. Mediante citometría de flujo estudiamos el efecto de medio condicionado de PMN en la expresión de ICAM y uPAR en células de tumor in vitro (Tu-iv). El agregado de medio condicionado de PMN aislados de animales con tumor a cultivos de Tu-iv produjo una pérdida en la adherencia celular al soporte junto a la disminución en la expresión de ICAM y uPAR a diferencia de lo observado con PMN de animales normales. Por otro lado, mediante inmunohistoquímica se analizó la expresión de N-cadherina en biopsias de tumor asociándose una mayor expresión con la progresión tumoral mientras que en Tu-iv solo se encontró un 20% de células positivas. Estos resultados sugieren que los mediadores liberados por los PMN están involucrados en la regulación de la expresión de moléculas que participan en la adhesividad celular. La ganancia en la expresión de N-cadherina en células tumorales podría asociarse con un aumento en el potencial invasivo facilitando su interacción con el endotelio vascular.

434. (3911) EFECTO DE DOS AGENTES TERAPÉUTICOS SOBRE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PACLITAXEL IN VITRO. ZERDIEW, ANA; RIVA, DIEGO; BAGNES, CLAUDIA; MERSICH, SUSANA

Depto de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. Oncología. Hospital Tornú. GCBA. Argentina.

Dentro de los compuestos con acción antineoplásica, el paclitaxel (P), desestabilizante de los microtúbulos, cuyo mecanismo de acción está aún en estudio, induce apoptosis por distintos caminos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la interacción de P con otros fármacos, como el ácido acetil salicílico (A) y un compuesto antioxidante y polivitamínico (V), en una línea celular de adenocarcinoma humano, A549. Para ello se in-

cubaron simultáneamente P+A y P+V durante 24-48 hs, a 37 °C. La evaluación de la supervivencia celular se realizó por a) una tinción con cristal violeta (CV), y b) una tinción con loduro de Propidio, para medir apoptosis por citometría de flujo (FACS). El estudio de la citotoxicidad para cada uno de los compuestos por separado, mostró que la concentración de P 3,75ug/ml afectó en un 50% a la supervivencia celular, A 10 mM fue una dosis no citotóxica, y V mostró un efecto de proliferación celular, con un máximo en 1,38 ug/ml. En la incubación de P+A ó P+V no se observaron diferencias significativas por CV (A 10mM y V 0,97ug/ml). Sin embargo el resultado para P+V (V 2,7ug/ml) fue de proliferación. La medida por FACS reveló en cambio, que mientras A no afecta la apoptosis inducida por P, V (0,69 ug/ml) incrementa la apoptosis por P, en un valor relativo de 30%, con respecto al valor individual. Por lo tanto, el efecto proliferativo observado en la interacción de P con V, ocurre sólo a una alta concentración de V y el sinergismo para el efecto apoptótico, de la combinación de P+V, observado por FACS, tiene lugar a una menor concentración de V. Estos resultados sugieren que la actividad biológica de V dependería de la dosis usada.

435. (4030) AUMENTO DE LA INFILTRACIÓN Y LA TUMORIGENICIDAD EN UNA LÍNEA DE MELANOMA HUMANO POR LA EXPRESIÓN DE MCP-1 (MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1). GAZZINAGA, SILVINA¹; BRAVO, ALICIA²; MASCHI, F³; MORDOH, JOSÉ⁴; WAINSTOK, ROSA¹

¹Dpto. de Química Biológica, FCEyN, UBA; ²Hospital Eva Perón ³Fac. Cs. Veterinarias, LaPlata, ⁴IIB-Fundación Leloir

La quimioquina MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) es una de las principales responsables de la formación de infiltrados monocito/macrofágicos en tumores. Hemos demostrado previamente que 100% de melanomas metastásicos humanos producen MCP-1. Importantes focos de macrófagos infiltrantes dentro del tumor se encontraron asociados a áreas de activa angiogénesis. Esto podría ser indicio de la ruta de extravasación de los macrófagos frente al estímulo quimiotáctico o de un efecto proangiogénico de los macrófagos reclutados. Para disponer de un modelo que nos permita estudiar más exhaustivamente el controvertido rol de los macrófagos infiltrantes de tumor, se transfectó la línea de melanoma humano IIB-MEL-J (MCP-1 < 12 pg/ml/106células/48 hs) con el plásmido pLXSN portador del cDNA para MCP-1 humano. Así se obtuvo la línea IIB-MEL-J-MCP-1 que produce 940 pg/ml/106 células/48 hs. Las células transfectadas tienen una capacidad migratoria 12 veces superior frente a medios condicionados ricos en componente de matriz y presenta menor adhesión al endotelio (15% vs 60%, MEL-J-MCP-1 vs mock). 30% de los ratones nude inyectados i.v. con 10^5 células MEL-J-MCP-1 desarrollaron metástasis pulmonares mientras que los inyectados con las líneas parental o mock no presentaron metástasis. Los tumores producidos por inyección subcutánea de MEL-J-MCP-1 presentan un infiltrado de macrófagos significativamente mayor tanto intra- como peritumoral, hasta el día 30. Dichos tumores presentan un tamaño mayor que los originados por la línea parental. Por lo tanto, hemos determinado que la expresión de MCP-1 en esta línea de melanoma produce quimioquina funcional capaz de reclutar macrófagos, incrementar su movilidad y promover la formación de metástasis y el crecimiento tumoral.

436. (4050) AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN ANTIGÉNICA DEL ADENOCARCINOMA DE ESTÓMAGO. CROCE, MARIA V¹; COLUSSI, ANDREA¹; CANESTRI, MARIO¹; REIS, CELSO²; SEGAL-EIRAS, AMADA¹

¹Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Fac de Ciencias Médicas, UNLP ²IPATIMUP, Universidad de Porto, Portugal

Objetivos: aislar y caracterizar líneas tumorales de cáncer gástrico e investigar la expresión de mucinas y epitopes carbohidratos en adenocarcinoma gástrico primario, líneas celu-

lares a corto plazo derivadas de éstos y en controles normales. Materiales: 15 muestras tumorales y 8 muestras de mucosa gástrica normal. Métodos: 1. Aislamiento de células para el cultivo por desagregación mecánica empleándose medio de cultivo RPMI 1640/ 10% SBF; 2. Ensayos de tumorigenicidad en ratones nude mediante inyecciones subcutáneas e intrabdominales. 3. Inmunohistoquímica en tumores primarios, líneas celulares y mucosa normal con distintos anticuerpos monoclonales reactivos con diferentes marcadores (tabla adjunta) y anti-citoqueratinas para evidenciar la naturaleza epitelial de las células aisladas. Resultados: se obtuvieron 6 líneas celulares de crecimiento a corto plazo y una a largo plazo. Las células tumorales crecieron en monocapa constituyendo una población homogénea con morfología epitelial y grandes núcleos. Las líneas tumorales mostraron un incremento en la expresión de sialil Lewis x, Tn y T respecto a los tumores primarios. La expresión antigénica de muestras tisulares normales y neoplásicas permitió observar los siguientes resultados expresados en porcentaje de positivos presentados en la siguiente tabla:

	MUC1	MUC6	MUC5AC	MUC2	MUC4	Sialil Lewis x	Tn	STn	T
Malignos (n=15)	80%	27%	47%	13%	20%	20%	27%	0%	7%
Controles (n=8)	88%	0%	14%	12%	12%	12.5%	22%	0%	0%

Conclusiones: 1-la metodología empleada permitió obtener cultivos celulares a corto plazo derivados de adenocarcinoma gástrico. 2- Se observaron variaciones de la expresión antigénica entre los tumores originales y las líneas celulares derivadas de los mismos así como entre las muestras malignas y controles.

TRANSDUCCION DE SEÑALES III

437. (3500) CROSS TALK MOLECULAR ENTRE GR, VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTES DE CAMP Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ACTIVADOS POR TCR EN LA APOPTOSIS DE CÉLULAS T. REFOJO, DAMIÁN; LIBERMAN, ANA CLARA; ECHENIQUE, CARLOS; ARZT, EDUARDO

CONICET Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA, Argentina

NF-KB, es un factor de transcripción (FT) y ERK una MAPK activados por el receptor T (TCR) y median la apoptosis a través de la inducción de FasL. La actividad transcripcional NF-KB fue inhibida 64% por Glucocorticoides (GC) y 85% por cAMP ($p < 0.01$ en ambos casos); y la actividad ERK lo fue en un 51% ($p < 0.05$) por cAMP. Además ambos bloquean la expresión de FasL por RT-PCR. El efecto de cAMP es dependiente de PKA e independiente de CREB dado que su efecto sobre la apoptosis y expresión de FasL es bloqueado por el inhibidor H89 pero no por oligonucleótidos secuestradores de FT CREB. Para dilucidar el sitio de acción del receptor de GC (GR) y cAMP sobre FasL, realizamos transfecciones con promotores de FasL río arriba del gen de luciferasa y sorprendentemente tanto cAMP como GC potenciaron el efecto inductor del TCR sobre los promotores ($p < 0.01$ en ambos casos y para todas las construcciones). Asimismo la apoptosis inducida por GC, un fenómeno dependiente de la actividad transcripcional de GR, es potenciada por cAMP en un 49% ($p < 0.05$). La actividad transcripcional de GR medida a través de un gen reportero también es potenciada por cAMP, un efecto dependiente de PKA e independiente de CREB. Además cAMP potencia el binding de GR a sus elementos respondedores y si bien no afecta la expresión de GR parece inhibir la degradación del receptor inducida por ligando. Conclusiones: Bloqueando NF-KB y ERK, cAMP y GR inhiben la expresión de FasL y la apoptosis inducida por activación T. La ausencia de efecto sobre el promotor evidencia un me-

canismo de regulación postranscripcional o la existencia de sitios regulatorios a distancia. Asimismo cAMP/PKA potencia la actividad transcripcional y la apoptosis dependiente de GR al modular el binding de GR al DNA y su tasa de recambio.

438. (3573) PAR2 INDUCE PROLIFERACIÓN EN FIBROBLASTOS HUMANOS A TRAVÉS DE UN MECANISMO CA(+2) INDEPENDIENTE Y PARTICIPACIÓN DE LAS ERK-P 1/2. ALBRECHT, MARTIN; FRUNGIERI, MONICA B; MAYERHOFER, ARTUR

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET, Argentina - Anatomical Institute, LMU, Munich, Alemania

Ciertos productos secretorios de los mastocitos estimulan la proliferación de fibroblastos, sugiriendo un rol de dichas células en fibrosis. La proteasa de serinas triptasa, es un producto de secreción de los mastocitos con una acción fibroproliferativa que involucra la activación del receptor activado por proteasa 2 (PAR2), aumento en la expresión de la ciclo-oxigenasa 2 (COX2, enzima clave en la biosíntesis de prostaglandinas, PGs) y unión de 15-deoxi-delta 12,14-PGJ2 (15d-PGJ2) a sus receptores nucleares PPARgamma (Frungeri y col., PNAS, 2002, 99: 15072). No obstante, los eventos intracelulares mediados por PAR2 permanecen aún sin ser esclarecidos. En este trabajo, experimentos realizados con el colorante Ca(2+) sensible fluo-4 AM y detección por microscopía confocal mostraron que 100% de las células de una línea de fibroblastos humanos (hFFF2) tratadas con tripsina (10 y 20 μ M), un agonista de los receptores PAR1/2, presentaron señal positiva de liberación de Ca(2+) intracelular. Contrariamente, el tratamiento con tripsina (120 y 1200 mIU/ml) no produjo señal positiva de liberación de Ca(2+) intracelular. Por las técnicas de RT-PCR y Western blot se estableció que, tanto tripsina (120 mIU/ml) como 8Br-cAMP (1mM), estimulan la expresión de COX2 y de las ERK fosforiladas 1/2 (ERK-P 1/2) en hFFF2. Un inhibidor de la cascada de MAP quinasas, PD98059 (10(-6) M), bloqueó el efecto inductor de tripsina sobre la expresión de COX2, de las ERK-P 1/2 y sobre la proliferación de hFFF2 ($p < 0.05$; Cell Proliferation Assay, Promega). Nuestros resultados indican que tripsina/PAR2 inducen la expresión de COX2 y posterior proliferación de hFFF2 a través de un mecanismo Ca(+2) independiente que involucra MAP quinasas.

439. (3770) SEÑALES INTRACELULARES INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA PROLIFERATIVA AUMENTADA DE CÉLULAS B INDUCIDA POR EXPOSICIÓN A ESTRÉS CRÓNICO. SILBERMAN, DAFNE MAGALÍ; GENARO, ANA MARÍA

Cefybo-CONICET

Previamente comprobamos que la exposición de ratones BALB/c a un modelo de estrés crónico heterotrópico induce un aumento en la respuesta proliferativa de linfocitos B (LB) estimuladas con lipopolisacáridos (LPS). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación de las señales tempranas clásicamente asociadas a la proliferación celular en esta alteración inmunológica. A tal fin, se evaluó la actividad de proteína quinasa C (PKC) y los niveles de AMPc tras estimulación con LPS en LB de ratones normales (N) y expuestos a estrés crónico (E). Pudimos observar que la estimulación de LB con LPS induce una mayor translocación de PKC a la membrana en LBE respecto de la observada en LBN ($X \pm EX$, membrana/citosol, basal N: $31 \pm 3/62 \pm 4$, E: $25 \pm 3/68 \pm 5$; LPS N: $51 \pm 4/42 \pm 3$, E: $66 \pm 5/28 \pm 3$, $n=10$). Con respecto a los niveles de AMPc se observó un incremento tras estimulación con LPS en LBN, mientras que, se observó una disminución en LBE ($p < 0.05$, $n=10$). La estimulación conjunta de LBN con LPS y 2ng/ml de PDBu (éster de forbol estimulador de la PKC) indujo un incremento de la proliferación celular (dpm de timidina incorporada, LPS: 118339 ± 11842 ; LPS+PDBu: 192340 ± 28773). Bajo estas condiciones experimentales pudo observarse una disminución de los niveles de AMPc. Estos resultados señalan el papel trascendental de la PKC como regulador positivo de la proliferación de células B inducida

por LPS y el posible papel del AMPc como regulador negativo de la misma. Se concluye que el estrés crónico induce en células B una mayor activación de PKC que modula los niveles de AMPcíclico y conlleva a una mayor reactividad de células B que podría estar implicada en la mayor incidencia de reacciones alérgicas reportadas en individuos bajo situaciones de estrés crónico.

440. (3817) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL CICLO GLUTAMATO/GLUTAMINA EN LA RETINA DEL HAMSTER DORADO. MINCES, LUCIANA; DANIEL, SAENZ; ANDREA, GOLDIN; MONICA, CHIANELLI; MARÍA INÉS, KELLER SARMIENTO; RUTH, ROSENSTEIN

Dpto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, U.B.A.

El glutamato es el principal neurotransmisor retiniano, aunque en concentraciones suprafisiológicas resulta altamente tóxico a nivel local. De hecho, se ha señalado al glutamato como factor causal en diversas patologías retinianas. En las células de Müller, las principales responsables del transporte del aminoácido, el glutamato es convertido a glutamina que transportada a neuronas, es reconvertida en glutamato, lo que completa el ciclo glutamato/glutamina. A pesar del rol potencialmente significativo del glutamato en la fisiopatología retiniana, los mecanismos bioquímicos que regulan el reciclado del transmisor han sido relativamente poco examinados. El objetivo de este trabajo fue examinar el efecto de la melatonina sobre la actividad de este ciclo retiniano en el hámster. Para ello, se analizó el influjo de glutamato (con 3H-glutamato), la actividad de glutamina sintetasa (por espectrofotometría), y de glutaminasa y el transporte de glutamina (con 3H-glutamina). La melatonina aumentó significativamente el influjo de glutamato (control: 34 ± 0.75 , melatonina 1nM: 40 ± 1 fmol/mg de tej.) y la actividad de glutamina sintetasa (control: 1.5 ± 0.03 ; melatonina 1 nM: 2.1 ± 0.1 μ mol/mg prot.15min). El metoxiindol disminuyó la actividad de glutaminasa (control: 62 ± 5 ; melatonina 1 nM: 50 ± 5 mmol/mg prot.h) y aumentó el influjo de glutamina (control: 9.5 ± 1 ; melatonina 1 nM: 14.5 ± 0.6 nmol/mg prot.min) Dado que un clearance adecuado del glutamato sináptico es imprescindible para una función normal de la sinapsis excitatoria y para prevenir la neurotoxicidad, estos resultados indican que la melatonina, favoreciendo la conversión de glutamato en glutamina, podría tener un rol neuroprotector significativo en patologías asociadas al aumento en los niveles de este neurotransmisor.

441. (3825) TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE INSULINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES LONGEVOS QUE NO EXPRESAN EL RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO (RATONES GHR-KO): EFECTOS DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA. ARGENTINO, DP; DOMINICI, FP; BARTKE, A; TURYN, D

IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Southern Illinois University School of Medicine, Springfield, IL, USA

En diversos modelos animales, la restricción calórica (RC) origina un aumento significativo de la duración de la vida y un retraso en el desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento. Se ha reportado una importante prolongación de la vida (38-55%) en ratones que no expresan el receptor de la hormona de crecimiento (GH); (ratones GHR-KO). Los mismos son deficientes en IGF-1, hipoinsulinémicos e hipoglucémicos características que podrían tener relación con su marcada longevidad. Interesantemente, existen evidencias que indican que los ratones GHR-KO sometidos a RC viven aún más que aquellos alimentados ad libitum (AL). El propósito del presente trabajo es determinar el mecanismo por el cual la RC extiende la vida en los ratones GHR-KO. Para ello se analizaron los efectos de la RC sobre los niveles circulantes de glucosa e insulina y sobre los primeros componentes de la vía de señalización de la insulina (fosforilación del receptor de insulina y su sustrato IRS-1) en músculo esquelético de ratones GHR-KO (-/-) de 16 meses de

edad y sus hermanos de camada (+/?) que fueron utilizados como controles (N). Ambos grupos de animales fueron sometidos a RC durante un año comenzando a los 4 meses de edad. Los resultados se compararon con los obtenidos en animales de la misma edad alimentados AL. La RC dió lugar a una reducción significativa de los niveles de glucosa tanto en ratones N como en ratones KO ($P < .001$ en ambos casos). Como se detectara previamente, los ratones KO evidenciaron una significativa reducción en la insulinemia a comparación de los valores normales ($.128 \pm .013$ vs. $.225 \pm .028$ ng/ml). La RC originó una reducción significativa en la insulinemia en animales N ($P < 0.03$ vs. N-AL) pero no modificó significativamente la insulinemia en animales KO. La RC no se asoció a cambios en la fosforilación del IR e IRS-1 estimulada por insulina en músculo esquelético en ninguno de los grupos analizados.

442. (3864) EFECTO DE LA TIROXINA SOBRE LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN ISOENZIMÁTICA DE PKC Y NOS EN LINFOCITOS T NORMALES Y TUMORALES MURINOS. BARREIRO ARCOS, MARÍA LAURA; GORELIK, GABRIELA; KLECHA, ALICIA; CREMASCHI, GRACIELA

CEFYO-CONICET Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA

Previamente demostramos que la tiroxina (T4) incrementa, en forma dosis dependiente, la proliferación del linfoma T murino BW5147 (BW) y potencia la de linfocitos T normales (LTN) estimulados con concanavalina A (Con A). Comprobamos un aumento del contenido total de PKC en ambos tipos celulares y de NOS sólo en BW. En este trabajo analizamos las acciones de T4 en las actividades y expresión de isoformas de las enzimas mencionadas. La incubación con T4 indujo un aumento rápido (3 min) en la traslocación de PKC sólo en BW (% actividad enzimática en membrana respecto del total, evaluada por fosforilación de un sustrato específico, T4: $57.0 \pm 5.3\%$ vs Basal - B -: $30.2 \pm 2.9\%$, $p < 0.05$). En ambos tipos celulares T4 incrementó, en 24 hs, los niveles de PKC en membrana y potenció la traslocación inducida por Con A en LTN (Con A: $58.5 \pm 4.6\%$ vs T4+ Con A: $79.0 \pm 7.0\%$, $p < 0.05$). Por Western blot se vió que T4 aumenta la expresión de la isoenzima atípica PKC zeta en BW y de las isoformas clásicas, alfa y beta en LTN. El incremento de actividad de NOS, determinada por formación de [14C]-citrulina a partir de [14C]-arginina, observado en presencia de T4 exclusivamente en BW, fue bloqueado por inhibidores selectivos de PKC (staurosporina, STAU) (actividad de NOS, en pmol/10(7)cel, B: 110 ± 9.3 , T4: 176.9 ± 12.3 , STAU: 70.8 ± 6.5 , $p < 0.01$). Asimismo la STAU disminuyó la expresión del ARNm de la isoforma inducible de NOS, determinada por RT-PCR, y de sus niveles proteicos, demostrando la estrecha relación entre ambas enzimas. Concluimos que la T4 modula diferencialmente la proliferación de LTN y BW mediante efectos, probablemente genómicos, que involucran el incremento de diferentes isoenzimas de PKC. Sin embargo, dicha hormona es capaz de inducir activación no-genómica de PKC y de estimular la actividad de NOS (cascada abajo de PKC) sólo en las células tumorales, lo que señalaría su contribución al estado hiperproliferativo de las células BW.

443. (3885) INTERACCIÓN DE LA MELATONINA CON EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE RETINIANO. MORENO, MARÍA CECILIA; CAMPANELLI, JULIETA; SANDE, PABLO; KELLER SARMIENTO, MARÍA INÉS; ROSENSTEIN, RUTH

Dpto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, U.B.A.

La retina es un sitio de síntesis activa de melatonina (MEL), en la que el metoxiindol parece tener una función esencialmente local. En este sentido, la MEL ha sido involucrada en la regulación de diversas funciones retinianas. Múltiples evidencias experimentales sugieren que en diversos sistemas biológicos, la MEL puede actuar como un agente antioxidante protegiendo

contra el daño causado por radicales libres. Dado que la retina es una estructura particularmente susceptible al daño oxidativo, debido a su alto consumo de oxígeno, su alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados y su exposición directa a la luz visible, el objetivo del presente trabajo fue examinar el efecto del metoxiindol sobre el sistema de defensa antioxidante endógeno en la retina de rata. Para ello, se analizaron las actividades de diversas enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD)), así como los niveles de glutatión reducido (GSH) y de peroxidación lipídica (niveles de TBARS) por métodos espectrofotométricos. En las retinas incubadas en presencia de MEL (0,1n -10nM), las actividades de SOD, catalasa, y GPX aumentaron significativamente (control: 112 ± 8.9 , MEL: 138 ± 7.2 UI/mg prot.; control: 36 ± 6 , MEL: 72 ± 6 nmol/min.mgprot.; control: 2.8 ± 0.2 , MEL: 3.4 ± 0.2 nmol/mgprot., respectivamente), así como los niveles de GSH (control: 41 ± 4.8 , MEL: 60 ± 3.8 nmol/mg prot.). Los niveles de TBARS disminuyeron significativamente (control: 0.47 ± 0.03 , MEL: 0.36 ± 0.07 nmol/min.mgprot.) Estos resultados indican que la melatonina en concentraciones fisiológicas aumenta la actividad del sistema de defensa antioxidante y sugieren que el metoxiindol podría actuar como un potente antioxidante endógeno retiniano.

444. (3903) ACTIVACIÓN DE LA PKC ZETA POR LA INSULINA EN EL TÚBULO PROXIMAL RENAL. ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO. NOWICKI, SUSANA; MUSOLINO, PATRICIA; CARRANZA, ANDREA; VILLAR, MARCELO; BARONTINI, MARTA

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), CONICET Facultad de Medicina, Universidad Austral

Hemos demostrado que la insulina (IN) incrementa la captación de L-dopa (DOPA) por células tubulares proximales aisladas (cTP) mediante un aumento del número de sitios de transporte de DOPA en la membrana, efecto mediado por la Protein Kinasa C (PKC). La PKC fosforila distintos componentes del citoesqueleto. El objetivo de este trabajo fue analizar: 1- cuáles isoformas de la PKC son activadas por la IN en cTP, 2- la participación del citoesqueleto de actina y tubulina en el aumento de la captación de DOPA por IN en cTP. 1- La translocación a la membrana plasmática, medida in vivo (perfusión seguida de inmunohistoquímica renal (IHQR)), e in vitro (incubación de cTP con IN y detección por Western Blot de PKC en citosol y membranas), se usaron como índice de la activación de las isoformas alfa, delta y zeta. Mediante IHQR se colocó en porciones discretas de túbulos proximales el receptor de IN y las tres isoformas de PKC. La administración de IN (40 mU/kg, i.v., 2min. antes de la perfusión, y 200µU/ml en el perfusato) produjo un evidente aumento de la señal de PKCzeta en la membrana de células proximales, siendo el efecto más sutil para las otras isoformas. La incubación de cTP con IN (50-1000 µU/ml, 2 min), produjo un incremento dosis- dependiente de la relación membrana/citosol (m/c) de las isoformas de PKC (%máx. de m/c respecto del control: PKCalfa, 139; PKCzeta, 224). 2- La despolimerización del citoesqueleto de actina (Citocalicina D, 1µM, CYT) inhibió el aumento de la captación de DOPA por IN (200 µU/ml, 2min) en cTP (pmol DOPA/mg prot/20min; DOPA 754±81; DOPA+IN 1241±160 p<0.05vsDOPA; DOPA+CYT 637±82; DOPA+CYT+IN 776±145 p<0.05vsDOPA+IN). La disrupción de los microtúbulos no modificó el efecto de la IN. Estos resultados demuestran una mayor activación de la PKC zeta por la insulina en cTP, y que los microfilamentos de actina participan en el reclutamiento de los sitios de transporte de DOPA a la membrana por efecto de la insulina.

445. (3943) IDENTIFICACIÓN DE GENES REGULADOS POR LA ACTIVIDAD DEL CFTR, CANAL DE CLORURO AFECTADO EN LA FIBROSIS QUISTICA (FQ). SOTOMAYOR, VERONICA; MARUCCI, FLORENCIA; SANTA COLOMA, TOMAS A

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Inv. Bioquímicas, Fund Inst Leloir

Con el fin de identificar genes dependientes de la actividad del CFTR se ha utilizado el método de differential display (DD) utilizando ARNm aislado de células de un paciente FQ, inmortalizadas con el antígeno t del SV40 (células CFDE), con las mismas células transfectadas, además, con el gen normal (6Rep/CFDE), y con estas últimas tratadas con un inhibidor específico del CFTR (glibenclamida, inhibidor del transporte de cloruro). Utilizando este método hemos encontrado varios genes asociados a la actividad del CFTR, por ejemplo, los genes que codifican para c-Src y ND4. En este trabajo se ha identificado por DD un gen que es expresado diferencialmente en pacientes con FQ (expresión disminuida en células CFDE) y cuyos niveles se ven aumentados en células transfectadas con el gen normal del CFTR (CFDE/6Rep). Luego del tratamiento de las células transfectadas (CFDE/6RepCFTR) con glibenclamida, el fenotipo se revierte y los niveles de expresión de este ARNm resultan otra vez similares a los de células CFDE (FQ). Este resultado indica no solo que existe una correlación, sino una relación causa-efecto directa entre la actividad del CFTR y los niveles de ARNm. El ARNm en cuestión, luego de ser secuenciado, demostró tener 100% de homología con una proteína aún no caracterizada y de función desconocida. Según datos extraídos del GenBank (ESTs), se expresa en células madres hematopoyéticas y también ha sido hallada en diversas líneas tumorales. A partir de un análisis de secuencia creemos que esta proteína constituiría un nuevo miembro de la familia de KLPs (Kinesin like proteins), la cuál podría tener una activa participación en el movimiento y segregación de cromosomas. Agradecimientos: Este trabajo fue hecho con subsidios de UBA, CONICET y Beca Carrillo-Oñativia.

446. (4020) LAS PROCIANIDINAS INHIBEN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-KB INDUCIDA POR TNF-A EN CÉLULAS CACO-2. ERLEJMAN, A.G.; FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I.

Depto de Química Biológica, IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Fisicoquímica, Programa de Radicales Libres (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Resultados previos del laboratorio demostraron que catequina, epicatequina (EC) y el dímero de EC inhiben la activación del NF-kB inducida por éster de forbol en células Jurkat (linfocitos T). Si bien hemos observado que EC y sus dímeros pueden cuantificarse en plasma humano, los oligómeros de EC, procianidinas (PC), no son absorbidos y su acción estaría restringida a la cavidad oral y al tracto gastrointestinal (TGI). El objetivo de este trabajo fue estudiar en células Caco-2, modelo de epitelio intestinal, la capacidad de las PC de modular la activación del factor de transcripción NF-kB inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF-a). Se determinaron: a) el efecto de PC sobre eventos tempranos en la activación del NF-kB, como la fosforilación (p-IkBa) y la degradación del péptido inhibitorio IkBa, por Western blot, y b) la actividad de unión del NF-kB al ADN en fracciones nucleares (FN), por EMSA. Las células se preincubaron 30 min con PC (1-20 µM) y luego se trataron con TNF-a. El TNF-a indujo un aumento en los niveles de p-IkB (máximo = 10 min) y una disminución en la concentración de IkBa (mínimo = 20 min). En las células pretratadas con PC se observó una inhibición dosis-dependiente de la fosforilación de IkBa y una disminución menor y más tardía (mínimo = 30 min) en la degradación de IkBa. En FN aisladas luego de 60 min de incubación con TNF-a se observó un aumento en la actividad de unión del NF-kB al ADN, que disminuyó de manera dosis (5-20 µM)-dependiente en las células preincubadas con PC. La inhibición por PC de la activación del NF-kB inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF-a) en células Caco-2 podría deberse en parte a la adsorción de PC a la membrana celular impidiendo la unión del TNF-a su receptor. Estos resultados sugieren una potencial acción antiinflamatoria de las procianidinas dietarias en el TGI.

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ORAL

ENDOCRINOLOGIA Y REPRODUCCION XI

447. (3272) FRACTURA (FX.) DE COLLES EN MUJERES POSTMENOPÁUSICAS (PM): SU RELACIÓN CON LA DENSITOMETRÍA ÓSEA (DMO) LUMBAR (DMO-L), FEMORAL (DMO-F) Y LA EDAD. MAURO, MARINA¹; FAREST AIE, ALBERTO¹; CLAUS-HERMBERG, HARALDO²

Clínica Colón, Mar del Plata¹, Hospital Alemán, Buenos Aires²

La Fx. de Colles es una de las fracturas más comunes en mujeres pm. Estudios epidemiológicos identificaron a la DMO y a la edad como importantes factores de riesgo de Fx. osteoporóticas vertebrales y extravertebrales. En el caso de las Fx. de Colles esta asociación no está claramente definida. Aprovechando la circunstancia de que la ocurrencia de una Fx. de Colles es un dato confiablemente registrable en un interrogatorio, pues es sintomático y requiere tratamiento, hemos analizado su relación con la DMO-L, la DMO-F y la edad en un estudio caso-control en mujeres pm. Población y Métodos: en el período abril 2001-abril 2002, 833 mujeres que efectuaron una DMO-L y/o DMO-F de rutina aportaron datos relativos a antecedentes de Fx. Colles. Resultados: prevalencia de Fx. Colles, 8.8%. DMO-L: 1.03±0.1 vs. 0.93±0.1g/cm² (controles vs. casos, p<0.01 U de Mann-Whitney); DMO-F: 0.7±0.1 vs 0.61±0.1 (p<0.01); Edad: 58±8 vs 65±8 años (p<0.001). Luego de sucesivas iteraciones, en la población >65 años no había diferencias en las DMO ni Edad entre casos y controles. <65 años, Prevalencia: 5.6%. DMO-L: 1.04±0.1 vs 0.92±0.1 (p<0.001); DMO-F: 0.72±0.1 vs 0.63±0.1 (p<0.001); Edad: 58±5 vs. 53±5 años (p<0.01) Ajustando las DMO a Edad (ambas variables correlacionan) no cambian sustancialmente los resultados.>65 años, Prevalencia: 19.8%. Riesgo Relativo (OR) (IC 95%) de pacientes con DMO-L y DMO-F por debajo del primer cuartil; todos: 3 (1.52-5.86), <65 años: 5.5 (2.5-12), >65 años: 1.14 (0.22-5.8). La DMO de las regiones más frecuentemente evaluadas para la prevención y el diagnóstico de la osteoporosis pm. y la edad se asocian significativa e independientemente con la prevalencia de Fx. Colles en mujeres <65 años. Esta asociación no se observa en mujeres mayores, posiblemente por la DMO generalmente baja en ese grupo etareo.

448. (3366) LA INHIBICIÓN DE LA DEGRANULACIÓN DE MASTOCITOS AFECTA LA ANGIOGÉNESIS EN EL CÉRVIX UTERINO DE LA RATA DURANTE LA PREÑEZ. BOSQUIAZZO, VERÓNICA L; VARAYOUD, JORGELINA G; RAMOS, JORGE G; MUÑOZ DE TORO, MÓNICA M; LUQUE, ENRIQUE H

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes. Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas UNL

El cérvix uterino durante la preñez presenta un activo proceso de angiogénesis. Debido a que existen antecedentes que relacionan este proceso con los mastocitos (MC), nos propusimos investigar si la inhibición de la degranulación de MC afecta la angiogénesis en el cérvix. Ratas preñadas fueron inyectadas con solución salina (controles) o con un estabilizador de la degranulación de los MC (cromoglicato de sodio, 87 mg/Kg/peso), desde día 12 (D12) hasta D18 de preñez. Los animales se sacrificaron los días D14, D18 y D22, dos horas antes se les inyectó bromodeoxyuridina (BrdU). Los cérvix se disecaron y se incluyeron en parafina. Por inmunohistoquímica se determinó: distribución de MC, BrdU incorporada, factor de von Willebrand y alfa-actina de músculo liso. Los parámetros de angiogénesis evaluados fueron: índice de proliferación endotelial (IPE), área vascular relativa (AVR) e índice de maduración vascular (IMV). El porcentaje de MC degranulados en D14 disminuyó significativamente

en los animales tratados con cromoglicato (84.9±3.8 vs 71.1±3.7). Dos de los parámetros de angiogénesis evaluados, el IPE y el AVR, disminuyeron significativamente en D18 y D22 (IPE-D18: 10.2±0.3 vs 6.8±0.7; D22: 4.8±0.7 vs 3.3±0.1; AVR-D18: 3.1±0.4 vs 1.5±0.4; D22: 4.8±0.7 vs 3.3±0.1). El IMV se incrementó en D18 (0.3±0.1 vs 0.7±0.1) y D22 (0.2±0.0 vs 0.4±0.1). Nuestros resultados sugieren que la degranulación de los MC es un proceso esencial para el desarrollo vascular del cérvix uterino durante la preñez y que podrían estar asociados con las modificaciones de la histoarquitectura cervical necesarias para un parto normal.

449. (3451) INTERRELACIONES MÚSCULO-HUESO EN RATONES SELECCIONADOS PARA CONFORMACIÓN CORPORAL. COINTRY, GUSTAVO; DI MASSO, RICARDO; CAPOZZA, RICARDO; FERRETTI, JOSÉ LUIS; FONT, MARÍA TERESA

Centro de Estudios de Metabolismo Fosfocálcico Inst de Genética Experimental y CEMFoC, Fac de Cs Médicas, CIC-UNR, Rosario

La selección artificial de ratones de ambos sexos con amplia variación en la conformación corporal (cuerpo liviano / esqueleto largo; cuerpo pesado / esqueleto corto) a partir de una línea parental (n=20/grupo), permitió analizar correlaciones entre indicadores de la calidad geométrica (diámetros, momento de inercia -MI-) y mecánica (resistencia a la fractura) del hueso cortical determinados tomográfica y destructivamente en las diáfisis femorales, y el peso de los músculos gastrocnemios en estado adulto, eludiendo las asociaciones alométricas que normalmente oscurecen las interrelaciones biomecánicas músculo-hueso. Los resultados sugieren que 1. la masa muscular (peso del gastrocnemio) no dependería alométricamente de la masa corporal en cualquier tipo de condición (p>0.05 siempre); 2. las proporciones geométricas entre longitud y grosor (diámetros, MI) diafisarios no serían determinantes independientes de la estructura ni la resistencia ósea (p>0.05 siempre); 3. el desarrollo muscular (masa) no dependería del óseo (longitud; p>0.05 siempre); 4. el diseño diafisario (MI) estaría condicionado más directamente por la capacidad muscular para deformar direccionalmente al esqueleto (peso del gastrocnemio; p<0.001) que por el peso del cuerpo; 5. la resistencia ósea estaría determinada significativamente por el diseño arquitectónico de las diáfisis (MI; p<0.001), y 6. esa adaptación biomecánica de la resistencia ósea al uso habitual del esqueleto estaría determinada más ajustadamente por la influencia dinámica de las contracciones musculares que por la carga estática del peso del cuerpo. El conocimiento de estas relaciones, difíciles de demostrar en condiciones naturales, es crucial para interpretar la homeostasis biomecánica de la estructura esquelética y la etiopatogenia de osteopenias y osteoporosis. No parece existir impedimento para extrapolarlo al análisis de cualquier osteopatía fragilizante humana.

450. (3576) MODULACION DEL RECHAZO EN UN MODELO IN-VITRO E IN-VIVO DE TRASPLANTE DE ISLOTES DE LANGERHANS: TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LOS AZÚCARES DE SUPERFICIE. VIEIRO, MERCEDES; CEBALLOS, CANDELA; HYON, SUNG HO; ARGIBAY, PABLO

Hosp. Italiano de Buenos Aires

Novedosas modificaciones en el protocolo de trasplante de islotes pancreáticos para la diabetes tipo 1 hacen posible la independencia de insulina con índices cercanos al 80%. Sin embargo, estos índices se obtienen mediante trasplante de islotes de 2 a 4 páncreas por receptor; debido básicamente a fenómenos inmunológicos. Las glicoproteínas O-glicosiladas desempeñan un rol en la interacción leucocito-célula blanco. Objetivo. Estudiar el efecto inmunomodulador de la remoción de O-sialoglicoproteínas de superficie de los islotes en la respuesta inmunológica alogeneica. Métodos. Los islotes de ratón C57BL/6 fueron tratados con O-sialoglicoproteína endopeptidasa

(OSEP) (0,12mg/ml, 37°C, 30min) o incubados en medio de cultivo (control). Se diseñó un cultivo mixto de 50 islotes irradiados (2000 rads) cocultivados 5 días con 2x10⁵ linfocitos de ratón C57BL/6 y C3H. Se agregó timidina tritiada 18hs antes de la cosecha y se evaluó la respuesta proliferativa alogénica (RPA, cpm) y la inhibición de la respuesta postratamiento (IPT). Por otro lado 200 islotes se alostrasplantaron en ratones C3H diabetizados con estreptozotocina (270mg/kg) y tratados con ciclosporina A diaria postrasplante (20mg/kg s.c.). Se determinaron glucemias diarias y se consideró reversión de diabetes a glucemias <250mg/dl en tres determinaciones consecutivas. Resultados. La RPA fue máxima con islotes control. Se observó inhibición de la misma con islotes tratados vs. control (1525vs.7294, 477vs.864, 172vs.689, 232vs.455, 728vs.1987) (p<0,01); con una media de 62% de IPT. El análisis de la funcionalidad post-transplante se realizó en términos de normogluceemia. Se obtuvieron diferencias significativas en los %reversión (rango 3 a 7 días) entre los ratones trasplantados con islotes tratados (n=6) vs. control (n=8); 50%vs.13% (p<0,002). Wilcoxon Mann-Whitney U-test. Conclusiones. El tratamiento de los islotes con OSEP podría tener un efecto inmunomodulador en el alostrasplante de islotes.

451. (3895) ALTERACIONES EN PARÁMETROS DE CALIDAD ESPERMÁTICA EN UN MODELO DE PROSTATITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (PAE). *MOTRICH, RUBEN D; **PONCE, ANDRES; **CARRASCOSA, RODOLFO; *RIERA, CLELIA M; *MACCIONI, MARIANA; *RIVERO, VIRGINIA E

Inmunología, Fac. de Cs. Químicas, Univ. Nac. de Córdoba* *Instituto de Fisiología Humana, Fac. de Cs. Médicas, Univ. Nac. de Córdoba*

En un modelo de PAE se estudiaron parámetros de calidad espermática debido a que, en trabajos anteriores, describimos alteraciones espermáticas en pacientes con Prostatitis Crónica No Bacteriana Autoinmune. Para ello 20 ratas Wistar se dividieron en 3 grupos: 1-Grupo CFA:(n=6) inmunizados con PBS en adyuvante de Freund completo (CFA). 2-Grupo EP:(n=7) inmunizados con extracto prostático de rata (EP)-CFA. 3-Grupo PSBP:(n=7) inmunizados con Prostataína (PSBP)-CFA. A los 37 y 53 días post-inmunización (dpi) se analizaron parámetros de calidad espermática: Concentración, Movilidad, Vitalidad, Permeabilidad de membrana (HOS) y % de acéfalos, en espermatozoides de semen obtenido por electroeyaculación y en espermatozoides epididimarios. En paralelo, se realizaron ensayos de proliferación de células mononucleares de bazo y ganglios linfáticos y determinación de IgG específica frente a EP y PSBP. Se realizó también un análisis histológico de diferentes órganos. Se encontró respuesta linfoproliferativa y autoanticuerpos contra antígenos prostáticos a los 37 y 53 dpi, en los grupos EP y PSBP, no así en el grupo CFA. El análisis histológico reveló infiltrados focalizados de linfocitos y células cebadas en próstata, sólo en los grupos EP y PSBP. No se observó lesión en testículo, vesículas seminales y riñón. El análisis de los parámetros de calidad espermática reveló una disminución significativa (p<0.05) en la concentración, movilidad, vitalidad y HOS y un aumento significativo (p<0.05) en el % de acéfalos, en espermatozoides eyaculados en los grupos inmunizados (EP y PSBP), respecto del grupo control. Estas alteraciones fueron más marcadas en el día 53 dpi y en el grupo EP. No se observaron alteraciones en espermatozoides epididimarios. Con estos resultados demostramos que animales con respuesta autoinmune hacia antígenos prostáticos presentan alteraciones en los diferentes parámetros de calidad espermática, lo cual reproduce lo observado en la patología humana.

452. (4010) IDENTIFICACIÓN DE UN AUTOANTÍGENO OVÁRICO EN PACIENTES CON FALLA OVÁRICA PREMATURA (POF). SUNDBLAD, VICTORIA; CHIAUZZI, VIOLETA A.; BUSSMANN, LEONARDO; CHARREAU, EDUARDO H.

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA.

La detección de anticuerpos circulantes dirigidos contra antígenos ováricos es uno de los principales elementos en la identificación de la etiología autoinmune de la Falla Ovárica Prematura (POF). En estudios previos, mediante Western-blots y utilizando como antígenos proteínas citosólicas de ovarios humanos, detectamos reacción positiva contra una proteína de peso molecular aproximado de 55 kDa, en el 16 % de un grupo de 110 pacientes POF. El objetivo del presente trabajo es la identificación de este antígeno ovárico hacia el cual están dirigidos los anticuerpos anti-ovario en pacientes POF. Homogenatos de ovarios humanos se centrifugaron a 105.000 x g durante 60 minutos. El sobrenadante fue sembrado en una columna CM Affi-Gel Blue (Bio-Rad) y las proteínas fueron eluidas con soluciones de NaCl de molaridad creciente. El seguimiento de las fracciones se realizó mediante Western-blots, evidenciándose la presencia del antígeno ovárico en el percolado. Posteriormente, se utilizaron ultrafiltros (Centricon-30, Amicon) para la concentración y enriquecimiento de esta fracción. El producto se corrió en un gel de poliacrilamida 10%-SDS y la banda correspondiente al antígeno ovárico fue analizada mediante MALDI-TOF-MS. El análisis reveló la presencia de la proteína citokeratina 10, tipo I (score = 414), y de la proteína enolasa 1 (alfa) (score = 368), siendo el score = -10 x log(P), donde P es la probabilidad de que la coincidencia del espectro obtenido con un péptido dado sea un evento al azar. Un score mayor a 74 es estadísticamente significativo (P<0.05). Nuevos estudios nos permitirán determinar con certeza hacia cuál de las proteínas identificadas están dirigidos los anticuerpos de las pacientes estudiadas.

INMUNOLOGIA X

453. (3410) LAS LIPOPROTEÍNAS DE BRUCELLA SPP. DES-ENCADENAN LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN BRUCELOSIS. ZWERDLING, ASTRID; CASSATARO, JULIANA; BRUNO, LAURA; FOSSATI, CARLOS A.; PHILIPP, MARIO T.; GIAMBARTOLOMEI, GUILLERMO H.

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, UBA.
Laboratorio de Inmunogenética, IDEHU, Tulane National Primate Center, USA.

La brucelosis es una enfermedad inflamatoria ocasionada por bacterias del género *Brucella*. Los medios que utilizan estas bacterias para desencadenar inflamación son desconocidos. A pesar de que bacterias enteras muertas por calor (HKBA) inducen inflamación, tanto el LPS como el ADN de *B. abortus* son relativamente ineficientes como estimuladores de la producción de citoquinas proinflamatorias. Esto implica que otros componentes bacterianos son los responsables de desencadenar la respuesta inflamatoria. Las lipoproteínas bacterianas son capaces de estimular la producción de citoquinas proinflamatorias, in vitro e in vivo. Se ha descrito que 3 proteínas de membrana externa de *B. abortus* (OMP10, OMP16 y OMP19) son lipoproteínas. El objetivo de este trabajo es, por tanto, investigar la función de las lipoproteínas de *Brucella* en el desarrollo de la inflamación en la brucelosis. Con tal fin se clonaron y purificaron OMP16 y OMP19, en su forma lipídada (L) y no lipídada (S), y se evaluó su actividad proinflamatoria en células THP-1. L-Omp16 y L-Omp19 (no así S-Omp16 y S-Omp19) estimularon la producción de TNF-alfa, IL-6, IL-12 e IL-10 en células THP-1 de manera dosis-dependiente. La polimixina B (inhibidor de la actividad del LPS) no modificó el efecto estimulador. Tanto HKBA como L-OMP16 y L-OMP19 indujeron la producción de TNF-alfa e IL-6 en macrófagos de ratones C3H/HeJ (incapaces de responder a LPS por expresar un receptor TLR4 no funcional). Contrariamente, células CHO (incapaces de responder a lipoproteínas bacterianas por expresar un receptor TLR2 no funcional) no respondieron al ser estimuladas con HKBA o L-OMP19. Nuestros resultados demuestran que las lipoproteínas son las moléculas presentes en la superficie de *Brucella* responsables de desencadenar, mediante la unión y activación de TLR2, la inflamación en brucelosis.

454. (3641) INTERACCIONES INMUNOENDÓCRINAS EN TUBERCULOSIS PULMONAR (TB).I. NIVELES CIRCULANTES DE INTERFERÓN GAMMA (IFN-G), INTERLEUCINA (IL) 10, IL-6, CORTISOL, DHEA, PROLACTINA (PR) Y SOMATOTROFINA (STH). MAHUAD, CAROLINA; BAY, MARÍA LUISA; DLUGOVITZKY, DIANA; BOZZA, VERONICA; DEL REY, ADRIANA; BESEDOVSKY, HUGO; BOTTASSO, OSCAR

Instituto de Inmunología-Facultad de Cs. Médicas. UNR Cátedra de Microbiología e Institute für Normale und Pathologische Physiologie, Marburg, Alemania.

Algunas citocinas inducidas durante la TB son capaces de interactuar con el sistema neuroendocrino, el cual a su vez modifica la respuesta inmune; por ello se investigaron los niveles circulantes de IFN-g, IL-10, IL-6, cortisol, DHEA, PR y STH, y sus eventuales interrelaciones. Se estudiaron 37 TB sin tratar (HIV negativos) clasificados en leves (n=11), moderados (n=13) y avanzados (n=13); y 22 controles (Co) sin diferencias en sexo y edad (media 46 años, rango 23-65). Ninguno registraba afecciones endócrinas, o tratamiento con corticoides o inmunomoduladores o embarazo. Las determinaciones (ELISA comerciales) mostraron mayores niveles de IFN-g ($p<0.02$) y cortisol ($p=0.012$) en los TB respecto de los Co, sin diferencias significativas de acuerdo a severidad. IL-6 e IL-10 también se vieron aumentadas en los TB ($p=0.002$), presentando una relación positiva y significativa entre concentración y mayor severidad. Los niveles de DHEA en los TB se ubicaron muy por debajo de los Co ($p<0.0001$), más evidente en las formas avanzadas. La relación cortisol/DHEA mostró una asociación positiva con la magnitud de la TB ($r=0.81$, $p<0.0001$). En cambio, PR y STH aparecieron elevadas en los pacientes ($p=0.03$ y $p=0.0004$, respectivamente), más aún en los avanzados. Al efectuar las correlaciones, IL-6 y cortisol mostraron asociación positiva y significativa en los TB ($p<0.0005$). El aumento en los niveles de citocinas podría conducir a una disfunción suprarrenal, con incrementos en la síntesis de Cortisol disociada de la correspondiente a DHEA, cuya disminución se relaciona con la gravedad de la TB. Aumentos en PR y STH podrían sugerir mecanismos orientados a compensar acciones anti-inflamatorias y promotoras de actividad Th2 que favorecerían el desbalance entre cortisol y DHEA

455. (3676) INTERACCIONES INMUNOENDÓCRINAS EN TUBERCULOSIS PULMONAR (TB).II. NIVELES CIRCULANTES DE INTERLEUCINA 6, (IL-6), TESTOSTERONA, ESTRADIOL Y HORMONAS TIROIDEAS. MAHUAD, CAROLINA; BAY, MARÍA LUISA; DLUGOVITZKY, DIANA; DÍDOLI, GRISELDA; DEL REY, ADRIANA; BESEDOVSKY, HUGO; BOTTASSO, OSCAR

Instituto de Inmunología, Facultad de Cs. Médicas, UNR. Cátedra de Microbiología; Institute für Normale und Pathologische Physiologie, Marburg, Alemania.

Las interacciones entre los sistemas inmune y neuroendócrino no sólo modifican la funcionalidad del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) sino también del gonadal (HPG) ocasionando cambios en la producción de esteroides sexuales; los cuales desempeñan conocidos efectos inmunomoduladores. Para ahondar en el conocimiento de dichas interacciones en la tuberculosis (TB), se analizaron las concentraciones plasmáticas de testosterona, estradiol y la relación con IL-6, dado la asociación observada entre esta citocina y los niveles de esteroides adrenales. El estudio se llevó a cabo en los mismos sujetos: 37 pacientes (leves, n=11; moderados, n=13 y avanzados, n=13) y 22 controles (media 46 años, rango 23-65). Las determinaciones se efectuaron por ELISA comerciales. La testosterona se halló descendida en los TB ($p<0.003$) más pronunciada en los severos (la producción en las mujeres fue menor con un ligero aumento en los TB), mientras que el estradiol se mostró aumentado ($p=0.01$, tanto hombres como mujeres) y aún más en los casos severos, regis-

trándose correlación importante entre este e IL-6 ($r=0.80$ $p<0.0001$). Para una mejor caracterización de la respuesta hormonal, también se analizaron las hormonas correspondientes al eje tiroideo (T3 y T4) cuyos niveles se vieron elevados en todos los pacientes ($p<0.005$ y $p<0.01$, respectivamente) y más aún en los severos. Las alteraciones previamente descritas del eje HPA y lo aquí expuesto señalan desregulación en los tres ejes hormonales durante la TB, en parte vinculado a las influencias de citocinas como la IL-6. Este conjunto de eventos contribuiría al desarrollo de una respuesta inmune inadecuada conducente a un deterioro progresivo, promovido además por la caída de testosterona y al aumento de las hormonas tiroideas.

456. (3769) LA ADICIÓN DE YOGUR A UNA DIETA DE RENUTRICIÓN MEJORA LA RESPUESTA FRENTE A UNA INFECCIÓN CON STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE. VILLENA, JULIO; RACEDO, SILVIA; AGÜERO, GRACIELA; ALVAREZ, SUSANA

Fac. Bioqca., Qca. y Fcia. Universidad Nacional de Tucumán Centro de Referencia para Lactobacilos

Las infecciones con *Streptococcus pneumoniae* son frecuentes y severas en pacientes desnutridos. Objetivo: estudiar el efecto del yogur en una dieta de renutrición, frente a una infección respiratoria con *S. pneumoniae* en ratones albino suizos desnutridos por déficit proteico. Animales desnutridos fueron renutridos durante 7, 14 y 21 días con dieta balanceada (DB), yogur (Y) o con DB suplementada con yogur (DB+Y). Al final de cada período, estos animales, controles bien nutridos (N) y desnutridos (D) fueron desafiados intranasalmente con *S. pneumoniae* (10(5) cél/ratón). Los días 1, 2, 5 y 10 post-infección se determinaron: peso; cultivo de pulmón y hemocultivo; recuento de leucocitos y fórmula en sangre periférica, fórmula leucocitaria en fluido broncoalveolar (BAL); peroxidasa (Px) en sangre, BAL y médula ósea; estudio histopatológico de pulmón e inmunoglobulinas A y G anti-estreptococo en suero y BAL por ELISA. Resultados: Todas las dietas incrementaron significativamente el peso de los animales desnutridos (N=25±1g; D=10±1; DB14d=22±1; Y14d=23±1), los cuales presentaban mayor susceptibilidad a la infección que los normales (N=3,6±0,3UFC/g; D=4,9±0,1). En los demás parámetros, los animales tratados con DB+Y14d se comportaron como los normales, lo que se logró a los 21d con las otras dietas de renutrición (Recuento de bacterias:DB21d=3.8±0,1 UFC/g; DB+Y14d=3,6±0,1. Px en BAL: N=164±4; D=84±4; DB+Y14d=164±4). La IgA en BAL alcanzó niveles mayores que el normal (DB+Y14d=1,80±0,01 DO/200ul N=1,65±0,02).El estudio histopatológico de pulmón mostró que en los animales alimentados con DB+Y 14d la respuesta inflamatoria fue similar al normal infectado, mientras que con DB se normaliza a los 21d. Conclusión: la administración de yogur, adicionado a una dieta de renutrición, induce una temprana recuperación de parámetros involucrados en la respuesta inmune, lo cual reduce el tiempo necesario para normalizar la respuesta de ratones desnutridos frente a una infección con *S. pneumoniae*

457. (3821) MECANISMOS ANTIINFLAMATORIOS ATENUAN EL DESARROLLO DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH). GOMEZ, SONIA ALEJANDRA; FERNANDEZ, GABRIELA; BUSTUOABAD, OSCAR; CAMERANO, GABRIELA; DRAN, GRACIELA; ALVES ROSA, FERNANDA; ISTURIZ, MARTIN; PALERMO, MARINA S

Academia Nacional de Medicina Instituto de Leucemia Experimental (ILEX)

El SUH es causado por *E. coli* productoras de toxina Shiga (Stx). La inoculación iv de Stx2 en ratones genera, por un lado, neutrofilia, activación de neutrófilos (PMN) y daño renal, y por el otro una respuesta antiinflamatoria a través de la secreción de glucocorticoides (GC) endógenos, que atenúa dicho daño. Previamente observamos que los GC disminuyen la toxicidad de la

Stx2 y que los PMN incrementan la expresión del receptor de GC (R-GC) en respuesta a la Stx2. Consecuentemente, nuestro objetivo fue estudiar si los GC endógenos contrarrestan la activación de los PMN por Stx2. Para ello analizamos el número absoluto de neutrófilos en sangre entera y la quimiotaxis (QTX) y adhesión (ADH) a proteínas de matriz extracelular (BSA y colágeno tipo I CTI) de PMN aislados de ratones a las 24 y 72 h luego del tratamiento con Stx2 y/o Ru486 (antagonista del R-GC). Stx2+Ru486 y Stx2 indujeron neutrofilia 72h post inoculación: 3328 ± 237 y 3293 ± 488 resp. vs sn salina (SF): 1088 ± 155 , $p < 0.001$ n=6/grupo. Al evaluar la QTX, la migración de PMN hacia fMLP, fue mayor a las 24h post Stx2+Ru486 (306 ± 60) respecto del grupo Stx2 (229 ± 91) y SF (240 ± 22), $p < 0.001$ n=9, expresado como % de aumento respecto del grupo SF sin agente quimiotáctico. Asimismo, la ADH a placas cubiertas con CTI y BSA, aumenta en PMN del grupo inyectado con Stx2+Ru486 72h post tratamiento: CTI: Stx2+Ru486: 213 ± 36 vs Stx2 102 ± 36 $p < 0.001$ n=8; BSA: Stx2+Ru486 171 ± 14 vs Stx2: 140 ± 3.5 , $p < 0.01$, n=8, expresado como % de aumento respecto de SF. Estos resultados indican que ante la ausencia de GC endógenos, el tratamiento con Stx2 en ratones genera un mayor estado de activación (ADH y QTX) en los PMN. Concluimos que los GC endógenos participan en la fisiopatología del SUH atenuando la activación inducida por Stx2 sobre los PMN.

458. (3927) LINFOCITOS TH2 SON RESISTENTES A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR GALECTINA-1: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS. TOSCANO, MARTA; ILARREGUI, JUAN MARTÍN; RUBINSTEIN, NATALIA; HERNANDEZ, JOSEPH; FAINBOIM, LEONARDO; BAUM, LINDA; RABINOVICH, GABRIEL

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín" Department of Pathology, School of Medicine, UCLA

Recientemente demostramos la capacidad de Galectina-1 (Gal-1) de inducir apoptosis de linfocitos T activados y su efecto inmunosupresor en modelos experimentales de autoinmunidad, generando una polarización hacia un perfil Th2 in vivo. El objetivo del presente estudio fue asociar estas observaciones experimentales y evaluar la susceptibilidad diferencial de linfocitos Th1 y Th2 a la apoptosis inducida por Gal-1. A tal fin células mononucleares de sangre periférica fueron activadas con PHA y polarizadas in vitro por 7 días con IL-12 y anti-IL-4 (Th1) o con IL-4 y anti-IL-12 (Th2). Posteriormente, estas células fueron incubadas en presencia o ausencia de Gal-1 ($40 \mu\text{g/ml}$) por 18h. Se observó que en células Th1, Gal-1 provoca un aumento en el porcentaje de células apoptóticas (Anexina V) en un $29.2 \pm 7.3\%$. Contrariamente, linfocitos Th2 no fueron susceptibles al tratamiento con Gal-1. A los fines de investigar los mecanismos involucrados, se evaluó la capacidad de unión de Gal-1 biotinilada a células polarizadas. Se observó un aumento en la interacción de Gal-1 con células Th1 en comparación con linfocitos Th2 (IFM= 30.2 vs 14.7). Posteriormente estudiamos el patrón de glicosilación diferencial de linfocitos Th1 y Th2 utilizando lectinas biotiniladas (SNA, PNA) y un anticuerpo anti core-2-O-glicanos. Se observó que células Th2 presentan un incremento en residuos de ácido siálico en unión a-2,6 y a-2,3 presentes en glicoproteínas receptoras de Gal-1. Determinamos que esta sialilación selectiva genera resistencia a la acción de Gal-1 en linfocitos Th2. El presente estudio permite postular un nuevo mecanismo, basado en la glicosilación diferencial, a través del cual Gal-1 ejerce su efecto inmunosupresor en modelos de autoinmunidad eliminando selectivamente linfocitos Th1.

459. (4037) ROL DE ANTÍGENOS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SOBRE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA TUBERCULOSIS HUMANA. PASQUINELLI VIRGINIA, QUIROGA M. FLORENCIA, MARTÍNEZ GUSTAVO J, CASTRO ZORRILLA LILIANA, MUSELLA ROSA M, BRACCO M. MARTA, MALBRÁN ALEJANDRO Y GARCÍA VERONICA E.

¹Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ²Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ³Laboratorio de Inmunología, Instituto de Tisioneumonología, Dr. Raúl Vaccarezza, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ⁴División Tisioneumonología, Hospital FJ Muñiz. ⁵Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina. ⁶Departamento de Alergia e Inmunología, Hospital Británico, Buenos Aires, Argentina.

La lipoproteína de 19KDa de Mycobacterium tuberculosis (MTB), activa respuestas proinflamatorias pero también inhibe la presentación antigénica con cinética retrasada, mientras que las proteínas del filtrado de cultivo (CFP) de MTB inducen inmunidad protectora. Factores como SLAM (molécula linfocitaria activadora de señales) estimulador de IFN-g, y SAP (proteína de unión a SLAM), inhibidor de IFN-g?? modifican las citoquinas producidas por linfocitos activados. Estudiamos el rol de 19KDa y CFP sobre la producción de IFN-g y expresión de SLAM en pacientes con tuberculosis (TBC) de alta respuesta (AR) y baja respuesta (BR) a MTB (según proliferación y producción de IFN-g). Los pacientes AR presentaron producción de IFN-g (??48h)? disminuida frente a 19KDa o CFP respecto a MTB sonicado. Contrariamente, los dadores sanos (DS) mostraron la mayor producción de IFN-g con 19KDa. Estimulando con MTB (pero no con 19KDa o CFP) y anti-SLAM aumentó significativamente el IFN-g en AR. Más aún, 19 KDa disminuyó la expresión de SLAM (5 días) tanto en AR como BR. Los pacientes con síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP) tienen SAP mutado, hiperproliferación de células productoras de IFN-g y desregulación de la vía de SLAM. En TBC, sólo se observa expresión de SAP en pacientes BR. En XLP observamos la mayor producción de IFN-g? con 19KDa y la menor producción frente a CFP. Sin embargo, 19 KDa disminuyó SLAM en XLP y la señalización vía SLAM indujo aumento de IFN-g? sólo frente a MTB. Nuestros datos sugieren que en TBC 19KDa podría tener rol inhibitorio o estimulador dependiendo del tiempo de activación linfocitaria. Más aún, la inhibición de IFN-g ?por 19KDa en TBC podría deberse a expresión diferencial de SAP, ya que los pacientes sin SAP (XLP y BR) no mostraron esta inhibición.

460. (4038) LA PROTEÍNA ASOCIADA A SLAM (SAP) Y NF-KB REGULAN LA PRODUCCIÓN DE IFN-G INDUCIDA POR LA MOLÉCULA LINFOCITARIA ACTIVADORA DE SEÑALES (SLAM) EN LA INFECCIÓN HUMANA INTRACELULAR. QUIROGA, FLORENCIA; MARTÍNEZ, GUSTAVO; PASQUINELLI, VIRGINIA; COSTAS, MONICA; GARCIA, VERONICA

Dto de Microbiología; Lab, de Inmunogenética, Fac de Medicina, UBA Laboratorio de Sustancias Vasoactivas. IDIM

La lepra es una enfermedad donde diferentes subpoblaciones celulares T reactivas a Mycobacterium leprae controlan su espectro clínico/inmunológico: los pacientes con lepra tuberculoides (T) montan fuertes respuestas celulares de tipo Th1??restringiendo el crecimiento bacteriano, mientras que las células T de pacientes lepromatosos (L) producen citoquinas Th2, presentando infección diseminada. Varios factores influyen los patrones de citoquinas producidos por células T, como la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM), inductor de IFN-g. Investigamos el rol de reguladores del gen de IFN-g Stat1, SAP (proteína asociada a SLAM) y NFkB, durante la señalización vía SLAM en lepra. La estimulación celular con M. leprae indujo fosforilación de Stat1 en pacientes T pero no en L. Sin embargo, la estimulación conjunta antígeno/anticuerpo anti-SLAM aumentó la fosforilación de Stat1 en individuos T e incrementó la activación de Stat1 en individuos L. Este efecto fue inhibido por anti-IFN-g, sugiriendo la participación del IFN-g producido en la activación de Stat1. Al estudiar la vía SLAM/SAP observamos una correlación inversa

entre expresión celular de SAP y producción de IFN-g en respuesta al antígeno. Interesantemente, la coestimulación vía SLAM en pacientes L disminuyó la expresión de SAP y aumentó el IFN-g. Mas aún, al estudiar la degradación de IκB se observó igual comportamiento. Estos resultados, corroborados estudiando unión de NFκB a su secuencia consenso y tratamiento con sulfasalazina, sugieren que la activación de NFκB en pacientes L requiere estimulación antigénica y coestimulación vía SLAM. Nuestros datos señalan nuevos aspectos sobre la señalización vía SLAM en infección por micobacterias, aportando herramientas para promover inmunidad protectora en lepra.

NEFROLOGIA IV

461. (3674) FARMACOCINETICA DE ANIONES ORGANICOS EN RATAS CON INSUFICIENCIA RENAL CRONICA. MAC LAUGHLIN, MYRIAM; BRANDONI*, ANABEL; VILLAR*, SILVINA R.; MARTINEZ*, ALEJANDRA I.; PICENA*, JUAN C.; ENDOU**, HITOSHI; TORRES*, ADRIANA M.

*Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA, CONICET. *Farmacología, Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR; **Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japón.*

Existe poca información respecto de la expresión y funcionalidad de transportadores renales de aniones orgánicos en presencia de insuficiencia renal crónica (IRC). El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la farmacocinética de p-aminohipurato (PAH) en un modelo experimental de IRC en ratas. Se trabajó con ratas Wistar macho a las que se les produjo IRC mediante reducción de 5/6 de su masa renal (IRC, n = 6) y con un grupo control (C, n = 5). Los estudios se realizaron 25 semanas después de la intervención quirúrgica. Se les determinó uremia (U) por espectrofotometría. Luego se les administró una dosis única de PAH (30 mg/kg p.c., i.v.), se recolectaron varias muestras de sangre durante el intervalo 0-15 min y una muestra de orina correspondiente a esos 15 minutos. En estas muestras se dosó PAH por espectrofotometría. Luego se extrajeron los riñones y se procesaron para estudiar mediante inmunohistoquímica a la proteína transportadora de aniones orgánicos (OAT1). Resultados (* P < 0.05): U (g/l): C = 0.49 ± 0.03; IRC = 1.96 ± 0.20*; Depuración sistémica PAH (ml/min/100 g p.c.): C = 1.48 ± 0.05; IRC = 0.88 ± 0.12*; Constantes de velocidad híbridas (min⁻¹): alfa: C = 7.01 ± 2.28; IRC = 1.22 ± 0.13*, Beta: C = 0.151 ± 0.006; IRC = 0.055 ± 0.009*; Constante de velocidad de eliminación K1-0 (min⁻¹): C = 0.550 ± 0.132; IRC = 0.108 ± 0.022*; Tiempo de vida media (min): C = 4.31 ± 0.14; IRC = 9.40 ± 1.09*. Volumen de distribución en estado estacionario (ml/100 g p.c.): C = 10.2 ± 0.4; IRC = 15.1 ± 0.5*, cantidad de PAH excretado en orina durante 15 min (ug/100g p.c.): C = 398 ± 111; IRC = 136 ± 45*. En el grupo IRC se observó una disminución en la intensidad de la inmunomarcación para el transportador OAT1. Las ratas con IRC mostraron disminución en la depuración sistémica y en la excreción renal de PAH que podría explicarse por una disminución en los niveles de OAT1 en membranas basolaterales de células de túbulo proximal (segmento S2).

462. (3793) INHIBICIÓN DE MONOAMINOOXIDASA(MAO) Y CATECOL-O-METILTRANSFERASA(COMT):CAMBIOS EN LA DOPAMINA(DA) RENAL. DE LUCA SAROBE, V; LEVIN, G; BARONTINI, M; ARRIZURIETA, E; IBARRA, F

Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, UBA CEDIE, Htal de Niños R. Gutierrez

MAO y COMT metabolizan e inactivan DA. Los efectos de la inhibición de MAO y COMT sobre DA urinaria y la excreción de electrolitos son contradictorios en la literatura. En SAIC 2001 mostramos que la actividad renal de estas enzimas varía con la ingesta de Na+. Se evaluó el efecto de la inhibición de MAO y COMT con

dietas de diferente contenido de Na+ en ratas Wistar macho adultas con ingesta de dietas normo(NS), hiper(HS) o hiposódicas(BS) por 6 ds, a las cuales se les administró el día 5 inhibidores de MAO (IMAO): Pargilina 50mg/Kg IP ó de COMT (ICOMT): Nitecapone 30 mg/Kg PO. Se recolectó orina diaria para determinar volumen (ml/d/100gPC), excreción de Na+ (mEq/d/100gPC), DA y ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) (ng/d/100gPC) y el cociente DOPAC/DA, evaluación indirecta de MAO. En NS IMAO provocó un aumento de la DA de 589±60 a 1128±159 (p<0.01) mientras que el DOPAC cayó al 50% del valor inicial (p<0.01); diuresis y natriuresis no cambiaron. Post ICOMT DA no cambió y DOPAC tendió a aumentar, la diuresis no se modificó y la excreción de Na+ aumentó de 0.06±0.01 a 0.12±0.02 (p<0.05). En el grupo BS DA aumentó con ambos tratamientos: basal 542±34, IMAO 997±43 (p<0.01), ICOMT 696±44 (p<0.02), el DOPAC cayó 3 veces post IMAO (p<0.01) y creció 4 veces post ICOMT (p<0.01). La excreción de Na+ tendió a aumentar post IMAO y aumentó post ICOMT de 0.006±0.0019 a 0.036±0.011 (p<0.02). La diuresis no se modificó. En el grupo HS ICOMT e IMAO no cambiaron DA y DOPAC. Los cambios en el cociente DOPAC/DA son *vsNSy*vsBSp<0.01

	NS	HS	BS	
Basal		3.7±0.4	2.9±0.8	7.1±1.9
IMAO		1.2±0.3*	2.4±0.9	0.5±0.08°
ICOMT		6.4±0.6*	1.05±0.5	19.8±1.2*

La respuesta a IMAO e ICOMT de DA urinaria y natriuresis cambia con la ingesta de Na+. Las ratas BS fueron más sensibles.

463. (3819) PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO 20-HIDROXIEICOSATETRAENOICO (20HETE), UN METABOLITO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA), EN LA INHIBICIÓN DE LA NA((+)),K((+))-ATPASA RENAL (NKA) POR LA DOPAMINA (DA). MENDEZ, CARLOS FERNANDO; PODESTÁ, ERNESTO; NOWICKI, SUSANA

Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE) CONICET

El 20HETE, producto del metabolismo del AA por el citocromo P450 (CYP), inhibe la actividad de la NKA en el túbulo proximal (TP). Nuestro objetivo fue estudiar la participación de los metabolitos del AA en la vía de transducción de señales de la DA, y del 20HETE en la inhibición de la NKA por la DA en el TP. La liberación de [(14)C] al medio y el contenido intracelular de metabolitos del AA (separación por TLC) se midieron en células OK, una línea celular de TP, preincubadas con [(14)C]AA. La actividad de NKA en segmentos de TP se midió por la hidrólisis de [gamma-(32)P]ATP. La DA (10 μM, 30 min) aumentó el contenido intracelular de distintos metabolitos del AA, y de la liberación de [(14)C] al medio, y este efecto fue anulado por la inhibición de la Fosfolipasa A[[2]] (ATK, 5 μM) (cpm/incubación: C 4219±24; DA 4666±38*; DA+ATK 2990±134; ATK 3242±162 n=3). La DA (10 μM, 30 min) inhibió la actividad de NKA en un 44% y este efecto fue suprimido por la inhibición del CYP (17ODYA, 10 μM) (pmol Pi/mm/h, C 3094±362; DA 1741±107*; 17ODYA 3400±55; 17ODYA+DA 2645±319; n=3). Se observó un efecto sinérgico entre una concentración umbral de 20HETE (1 nM) y el agonista D[[1]] Fenoldopam (FE, 10 μM) (pmol Pi/mm/h, C 2823±244; FE 2828±398; 20HETE 2854±572; FE+20HETE 1306±880*; n=4) ó el activador de la PKA Forskolina (FK, 10 μM) (pmol Pi/mm/h, C 3169±424; FK 2853±401; 20HETE 2692±437; FK+20HETE 1958±320*; n=4). El agonista D[[2]] quimpirol no modificó la actividad de la NKA per se ni en presencia de 20HETE. * p<0.05 vs. control según ANOVA. Nuestros resultados demuestran que la DA aumenta la liberación y el metabolismo del AA y que sus metabolitos están involucrados en la vía de transducción de señales de la DA. Los efectos inhibitorios de la DA sobre la NKA están mediados por el 20HETE, que tiene un efecto sinérgico con las señales del receptor D[[1]].

464. (3914) EFECTO DEL DEFICIT DE VITAMINA B12 Y ÁCIDO FÓLICO DURANTE LA PREÑEZ SOBRE EL NÚMERO DE GLOMÉRULOS DE LAS CRÍAS. OSSANI, GEORGINA; UCEDA, ANA; CARAM, SILVIA; DÍAZ, MARISA; MONSERRAT, ALBERTO

Patología Experimental, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA Medicina Nuclear, Hospital Británico

Está demostrado que la deficiencia gestacional de colina, pro-teínas o vitamina A produce una disminución del número de glomérulos en las crías. Dada la interrelación metabólica entre la colina, la vitamina B12 (B12) y el ácido fólico, el objetivo de este trabajo fue observar si las últimas dos vitaminas tenían el mismo efecto sobre el número de glomérulos. Ocho ratas Wistar, hembra, fueron alimentadas durante la gestación con dietas isocalóricas sin B12 y ácido fólico (dieta deficitaria-DD) o con estas vitaminas (dieta suplementada-DS). El día del parto se obtuvo sangre para dosaje de ambas vitaminas, urea y homocisteína. Durante la lactancia recibieron dieta standard comercial (Cargill). Las crías de ambos grupos fueron sacrificadas a los 28 días. El riñón derecho fue estudiado por microscopía de luz y el izquierdo procesado por el método de Damadian y col. para recuento de glomérulos. Los resultados en el momento de parto fueron (X±DS): B12 (pg/ml): DD 23.3±4.6, DS 292.6±79.5 (significativo: S); ácido fólico (ng/ml): DD 5.36±2.77, DS 7.41±3.76; urea (g/L): DD 0.32±0.21, DS 0.35±0.21; homocisteína (mMoles/L): DD 14.83±5.19, DS 6.98±1.72 (S). El peso corporal de las crías al nacer fue (g): DD 5.42±0.16, DS 5.6±1.2. El peso corporal final fue (g): DD 90.05±6.3, DS: 90.4±13.3. El número de glomérulos fue: DD 25254±1986, DS 32657±1777 (S). Se demuestra que el efecto del déficit gestacional de vitamina B12 y ácido fólico sobre los glomérulos de las crías es una franca disminución de su número, siendo la diferencia entre los grupos significativa.

465. (4032) MODELO ADAPTATIVO DEL BALANCE HIDROSALINO EN BUFO ARENARUM. DESDE LA CONDUCTA A LAS MOLÉCULAS. SEGURA, ENRIQUE; MUZIO, RUBEN; REBORDA, JUAN C

Lab. Biología del Comportamiento. IBYME, CONICET

Se describen cambios en la histología renal coincidentes con la oliguria refleja consecutiva a la estimulación osmótica de la piel en el sapo Bufo arenarum. Se usaron sapos normales no anestesiados, adaptados a un medio de agua deionizada, expuestos por períodos breves (1, 5, 10 o 30 min) a un ambiente hiperosmótico (NaCl 0.4M). Se realizaron estudios histológicos y morfométricos del riñón por microscopía óptica. Los resultados indican que el medio hiperosmótico produjo los siguientes cambios: a) contracción general de las áreas glomerulares con marcada reducción del espacio de Bowman desde el minuto 1 al 5 (P<0.01) b) expansión glomerular en el minuto 10 (P<0.01) c) aumento significativo del lecho vascular glomerular entre el minuto 10 y 15, para retornar a los valores controles al minuto 30 d) marcada reducción del lumen de los túbulos proximales, células parietales de límites muy mal definidos y núcleos desplazados hacia la región basal del citoplasma. Todos los cambios morfológicos descriptos revirtieron dentro de las 24 horas de la reposición en agua deionizada. En otro grupo de animales tratados previamente con el simpatopléjico guanetidina se observó una significativa y persistente expansión del área glomerular a expensas especialmente del espacio de Bowman. Los cambios renales coincidieron en el tiempo con la oliguria descripta previamente en nuestro laboratorio utilizando la misma preparación. La regulación de las reservas y el balance acuoso en la especie analizada cuenta con un mecanismo adaptativo en el cual el control de la función renal por parte del sistema adrenérgico resulta fundamental.

466. (4065) EFECTOS DE LA AMILORIDA SOBRE LA EXCRECIÓN DE NA+, K+ Y CL- EN PACIENTES CON IRC. YEYATI, NESMO

Hospital de Clínicas José de San Martín, Depto. de Fisiología Facultad Medicina, UBA

La amilorida bloquea los canales de Na⁺ hiperpolariza la membrana apical de las células principales, e impide la salida del K⁺ por canales conductivos tipo ROMK. En 8 pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) con volúmen de filtrado glomerular menor de 20 ml/min, estudiamos los efectos de la administración de la amilorida (1mg/kg. y 1mg/kg/h) sobre la EFNa, EFK, y EFCI. Los resultados fueron comparados con los obtenidos en sujetos normales. En los normales, la EFNa aumentó de 2,3 ± 0,2 a 3,4 ± 0,3 % (p < 0,025), la EFK disminuyó de 25,5 ± 5,5 a 7 ± 0,8 % (p < 0,02), la EFCI no cambió. En los pacientes con IRC, la EFNa aumentó de 15,6 ± 1,4 a 20,5 ± 1,2% (p < 0,05), la EFK disminuyó de 131 ± 38 a 39 ± 5 % (p < 0,05), la EFCI no varió. En la IRC la tolerancia al potasio depende de un aumento adaptativo de su secreción por las células principales de los nefrones residuales. Por efecto de la amilorida es posible inhibir la secreción de K⁺ dependiente de la reabsorción de Na⁺ y del gradiente electroquímico que éste genera en el nefrón distal. Se concluye que los canales ROMK no serían cerrados por la amilorida y no se afectaría la reabsorción de Cl⁻ a pesar de la marcada inhibición de la reabsorción del Na⁺. La secreción de K⁺ que persiste en presencia de la amilorida sería independiente del gradiente electroquímico que la reabsorción de Na⁺ genera. Se postula entonces un mecanismo amilorida-sensible y otro insensible, ambos estimulados en la IRC.

NEUROCIENCIAS V

467. (3718) ACTIVIDAD AUTONÓMICA CARDÍACA EN PACIENTES CON ANOREXIA NERVIOSA, BULIMIA NERVIOSA Y SUJETOS NORMALES COMPARABLES. GUINJOAN, SALVADOR M.; ROVIRA, BERNARDO; CHANDLER, EDUARDO; DORPINGHAUS, ANDREA; LADRÓN DE GUEVARA, M. SOLEDAD; FAHRER, RODOLFO; NICOLA SIRI, LEONARDO; CARDINALI, DANIEL

Dto. de Salud Mental Hospital de Clínicas y Dto Fisiología, Fac. de Medicina, UBA

Fundamentos: Las pacientes con anorexia nerviosa o con bulimia nerviosa padecen severos desequilibrios nutricionales e hidroelectrolíticos, a pesar de lo cual rara vez sufren arritmias cardíacas malignas. No esta claro si los trastornos de la conducta alimentaria se diferencian entre sí de acuerdo al perfil de actividad autonómica. Objetivo: Caracterizar la actividad autonómica cardíaca en los trastornos de la conducta alimentaria (anorexia nerviosa y bulimia nerviosa). Métodos: Estudio observacional prospectivo y controlado sobre el análisis de la variabilidad de la frecuencia cardíaca en registros de 550 latidos sinusales consecutivos, en condiciones de reposo (predominio parasimpático) y bipedestación (predominio simpático) obtenidos en 12 mujeres con anorexia nerviosa (AN), 13 mujeres con bulimia nerviosa (BN) y 20 mujeres normales (C) de edad comparable. Resultados: La única diferencia demográfica entre C, AN y BN fue que estas últimas tuvieron un peso y un índice de masa corporal mayor a los otros grupos. Las pacientes con AN tuvieron una frecuencia cardíaca menor a las personas del grupo BN (RR [mseg] 910 ± 175 vs. 776 ± 118; p= 0,032) y una actividad simpática menor a C (LF [log mseg(2)] 2,73 ± 0,42 vs. 3,16 ± 0,4 p= 0,022) en el reposo. Durante la bipedestación, las pacientes con AN tuvieron un control autonómico cardíaco globalmente reducido (variabilidad total [log mseg(2)] 3,20 ± 0,35 vs. 3,54 ± 0,3; p=0,024) en comparación con individuos normales, y una tendencia no significativa a mostrar una actividad simpática menor en esa situación. AN exhibe anomalías distintivas en el control autonómico cardíaco, en comparación con C y BN, y estas alteraciones no se explican por factores antropométricos relacionados con el trastorno de la conducta alimentaria

468. (3726) LA ACTIVIDAD AUTONÓMICA CARDÍACA DE PACIENTES CON TRASTORNOS DE LA ALIMENTACIÓN NO

ESTÁ RELACIONADA CON SU SINTOMATOLOGÍA DEPRESIVA. DÖRPINGHAUS, M.ANDREA; ROVIRA, BERNARDO; CHANDLER, ALBERTO E.; NICOLA SIRI, LEONARDO; LADRON DE GUEVARA, SOLEDAD; FAHRER, RODOLFO; CARDINALI, DANIEL P.; GUINJOAN, SALVADOR M.

Hospital de Clínicas José de San Martín Departamento de Salud Mental, Hospital De Clínicas Y Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina

Fundamentos: En diversos grupos de pacientes, la presencia de depresión está relacionada con anomalías autonómicas. Los pacientes con trastorno de la alimentación tienen una alta incidencia de síntomas depresivos y exhiben anomalías de la función autonómica cardíaca. Objetivo: Determinar la relación entre actividad autonómica y síntomas depresivos en una muestra de pacientes con trastornos de la conducta alimentaria, bulimia y anorexia. Métodos: En una muestra de 12 pacientes con anorexia nerviosa y 13 pacientes con bulimia nerviosa, se estudió la actividad autonómica mediante el análisis de la variabilidad de la frecuencia cardíaca en series de 550 latidos sinusales consecutivos, y la presencia de síntomas depresivos mediante una escala de Hamilton de Depresión de 21 ítems. Se determinó la existencia de correlaciones entre el nivel de sintomatología depresiva y los distintos indicadores de actividad vagal y simpática cardíaca. Resultados: Los valores de reposo de la duración de latido promedio mostraron un $r = 0,128$ y una $p = 0,499$. Las correlaciones tampoco fueron significativas para el caso de una serie de parámetros de actividad parasimpática ($r_{MSNN} = -0,070$, $P = 0,714$; $\log HF = -0,248$, $p = 0,187$) ni simpática ($\log LF = 0,240$, $p = 0,201$). Tampoco hubo correlaciones de la sintomatología depresiva con parámetros autonómicos en la situación de bipedestación. Conclusión: A diferencia de otros grupos de pacientes (p.ej., con depresión mayor aislada o con depresión mayor en el contexto de enfermedad coronaria), en el caso de pacientes con anorexia nerviosa o bulimia nerviosa, las anomalías autonómicas observadas no se explican por la alta prevalencia de síntomas depresivos que padecen.

469. (3738) EL TRATAMIENTO PROLONGADO DE RATONES WOBBLER CON PROGESTERONA REVIERTE LA DEFICIENCIA DE PARAMETROS NEUROMUSCULARES. GONZALEZ DENISELLE, MARIA CLAUDIA; GARAY, LAURA; GONZALEZ, SUSANA; ROIG, PAULINA; DE NICOLA, ALEJANDRO F.

El ratón Wobbler (Wr), modelo de enfermedad de motoneurona, se caracteriza por vacuolización y pérdida de motoneuronas espinales, y atrofia muscular. En Wr clínicamente sintomáticos, se demostró reducción del transporte axonal retrógrado (TAR) de la placa neuromuscular al soma neuronal. En este trabajo estudiamos el efecto neuroprotector de progesterona (PROG) sobre TAR, la expresión de colina-acetiltransferasa (ChAT) en motoneuronas y el peso muscular. Se utilizaron 4 grupos: controles (CTL), Wr, CTL+PROG y Wr+PROG (pellet PROG de 20 mg x 60 días). Para estudiar TAR, se inyectaron 8 μ l de 2.5% fluorogold en bíceps brachii y músculos flexores superficiales 6 días antes del sacrificio. Las neuronas fluorescentes en asta ventral de médula cervical se cuantificaron en microscopio de fluorescencia. En Wr disminuyó el % de las motoneuronas fluorescentes respecto a CTL (Wr: 17.8 ± 6.6 vs. CTL: 31.1 ± 1.3 ; $p < 0.01$); mientras que en Wr+PROG los valores fueron similares a CTL (Wr+PROG: 29.8 ± 3.2 vs. CTL, NS); (Wr+PROG vs. Wr; $p < 0.01$). El número de motoneuronas inmunoreactivas para ChAT fue un 40% menor en Wr en relación a CTL (Wr: 155.6 ± 10.1 vs. CTL: 268.5 ± 19 ; $p < 0.001$). En Wr+PROG se elevó un 20% el no. de neuronas ChAT+ / área vs. Wr no tratados (Wr+PROG: 205.5 ± 1.8 vs. Wr; $p < 0.05$). En CTL+PROG, los valores fueron similares a CTL. La acción de PROG fue evidente sobre el trofismo muscular, ya que el peso del bíceps brachii fue 1.7 veces mayor en Wr+PROG vs Wr no tratados (Wr+PROG: 11.1 ± 1.3 mg vs Wr: 6.6 ± 0.7 ; $p < 0.05$). El peso de bíceps de CTL fue 3.6 veces superior al de Wr (CTL: 23.8

± 1.2 ; $p < 0.001$). Conclusión: La neuroprotección por progesterona se evidencia en ratones Wobbler a través de la recuperación de parámetros relacionados al transporte axonal retrógrado, a la expresión de la enzima clave de la síntesis de acetilcolina y al trofismo muscular.

470. (3781) NEUROMODULACIÓN ENDÓGENA COMO MECANISMO DE DEFENSA PARA LA TERMINAL NERVIOSA MOTORA. DE LORENZO, SILVANA; VEGGETTI, MARIELA; MUCHNIK, SALOMÓN; LOSAVIO, ADRIANA

Laboratorio Neurofisiología Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA

En reposo ($K(+)$ 5mM), ATP y su metabolito adenosina (AD) inducen inhibición presináptica (IP) de la liberación espontánea de ACh en sinapsis neuromuscular de mamífero, al activar sus receptores (R) presinápticos P2Y y A1 respectivamente. Anteriormente demostramos que CCPA (agonista selectivo de RA1) no ejerce su efecto modulador cuando la liberación tónica está aumentada al exponer las preparaciones a altas concentraciones de $K(+)$, debido presumiblemente a que los RA1 están ocupados por la AD generada a partir del ATP. Para comprobarlo, en hemidiafragmas de ratones CF1, registramos la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPPs) evocada por alto $K(+)$, en presencia de adenosina deaminasa (ADA), enzima que degrada la AD endógena en su metabolito inactivo inosina. En 15 y 20 mM $K(+)$ ADA incrementó fMEPPs un 30.7 ± 0.3 %, $n:3$ y 54.1 ± 2.9 %, $n:3$ con respecto a los valores obtenidos sin la droga. En estas condiciones, CCPA ejerció su efecto inhibitorio. Por otro lado, para investigar si en situaciones de exagerada actividad neuronal, el ATP exógeno posee un comportamiento similar a CCPA, estudiamos el efecto de ImidoATP (análogo no hidrolizable del ATP) sobre la fMEPPs inducida por alto $K(+)$. En 10, 15 y 20 mM $K(+)$, ImidoATP no logró inducir IP. Para evaluar si el ATP coliberado con ACh (ATP endógeno) ocluye el efecto de ImidoATP, se midió fMEPPs en presencia de un antagonista P2Y (Reactivo Azul). En 10, 15 y 20mM $K(+)$, Reactivo Azul incrementó fMEPPs un 59.3 ± 17.2 %, $n:4$; 67.3 ± 21.0 % y 57.5 ± 7.4 %, $n:4$ con respecto a los valores obtenidos sin el antagonista. Estos resultados sugieren que en la terminal nerviosa motora tanto ATP como AD endógenos modulan la excesiva liberación de ACh protegiendo al sistema de un posible daño neuromuscular.

471. (3884) ANÁLISIS CLÍNICO DE PACIENTES CON EPILEPSIA Y PSICOSIS. D'ALESSIO, LUCIANA; GIAGANTE, BRENDA; ODDO, SILVIA; SILVA, WALTER; SOLIS, PATRICIA; CONSALVO, DAMIAN; CENTURION, ESTELA; SAIDON, PATRICIA; KOCHEN, SILVIA; ZIEHER, LUIS

Centro de Epilepsia Htal R Mejía Inst Biología Celular y Neurociencias Dr Eduardo De Robertis UBA 1ra Catedra de Farmacología. CONICET. CEFYBO

Objetivo: Determinar las características clínico-evolutivas de los episodios psicóticos en pacientes con epilepsia y correlacionar los parámetros neurológicos, psiquiátricos y farmacológicos entre ambas entidades (psicosis y epilepsia). Material y Método: Del total de la población de pacientes epilépticos con evaluación psiquiátrica que concurren al Centro de Epilepsia, se seleccionaron 15 pacientes con episodios psicóticos transitorios y/o permanentes. En todos los casos se realizó: historia clínica, evaluación neurológica, electroencefalograma y resonancia magnética nuclear (RMN). La semiología psiquiátrica se complementó con la administración de entrevistas estructuradas DSM IV, SCID-I, la escala PANSS y la clasificación ictal de psicosis epiléptica (CIPE). Resultados: Quince pacientes epilépticos cumplieron criterios diagnósticos para trastornos psicóticos. El 73% de los pacientes tenía diagnóstico de epilepsia temporal, de los cuales el 63 % presentó esclerosis hipocámpal con o sin patología dual en la RMN (55% izquierda y 22% bilateral). El 27% tenía epilepsia extratemporal. Según el DSM IV el trastorno más frecuentemente hallado fue el episodio psicótico breve. Según la CIPE el

33% de los pacientes presentó psicosis post-ictal, 33% formas agudas interictales y el resto formas interictales crónicas. El 60% del total de la población, requirió tratamiento prolongado con antipsicóticos. Las psicosis epilépticas halladas con más frecuencia son las formas agudas transitorias, que para la CIPE se corresponderían con las formas breves de presentación post-ictal. Estos casos presentaron una evolución favorable con restitución ad- integrum. En la población estudiada, el tipo de epilepsia más frecuente fue la epilepsia temporal con esclerosis hipocámpal.

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ORAL

PREMIO MONTUORI

En virtud de que serán pre-seleccionados por los Jurados 6 postulantes para concursar por los respectivos Premios en las sesiones dedicadas a los mismos, los inscriptos no seleccionados, presentarán sus trabajos en las sesiones de sus áreas temáticas correspondientes.

472. (3261) DETECCIÓN DE MICROMETÁSTASIS DE MELANOMA MALIGNO EN GANGLIO CENTINELA MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR. DENNINGHOFF, VALERIA; KAHN, ANDREA; FALCO, JORGE; CURUTCHET, HECTOR; ELSNER, BORIS

CEMIC CEMIC, Servicio de Patología. Hospital de Clínicas, Servicio de Patología y División de Cirugía.

La correcta estadificación de los ganglios linfáticos en pacientes con melanoma maligno es el factor pronóstico de mayor importancia. Pacientes con ganglios linfáticos clínicamente positivos (estadio III) deberán recibir linfadenectomía terapéutica, sin embargo, la intervención quirúrgica de la enfermedad regional en pacientes con examen clínico negativo (estadio I y II) es aún controversial. La linfadenectomía selectiva es un procedimiento que consiste en la identificación intraoperatoria del primer ganglio en la cadena linfática, el ganglio centinela (GC). El examen de rutina, las secciones seriales y la inmunohistoquímica (IHQ) podrían subestimar la presencia de células tumorales. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que ha sido propuesta como un método adicional para la detección de micrometástasis de melanoma maligno en GC. El objetivo de este estudio es utilizar la amplificación del RNAm de la tirosinasa para la detección de micrometástasis en GC. Se incluyeron en este estudio 46 GC negativos para hematoxilina-eosina correspondientes a 42 pacientes con melanoma maligno. Se realizó inmunohistoquímica (S-100 y HMB-45) a cortes fijados con formol e incluidos en parafina. Una porción central del GC, conservada a -70°C , fue sometida a una RT-PCR nested para la tirosinasa usando primers outer y nested secuencia-específicos. Mediante IHQ se identificaron micrometástasis en 2 de los 46 GC. Con biología molecular fueron positivos 14 de los 46 GC examinados (30.3%), incluyendo los dos casos positivos con IHQ antes mencionados. Los GC con RT-PCR positiva representan un depósito metastásico verdadero en este grupo de pacientes. Los casos positivos solamente con biología molecular fueron sometidos a un seguimiento cercano.

473. (3359) EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO MODULA LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS TUMORALES. GALLI, SOLEDAD; LABATO, MARIANA; CARRERAS, MARÍA CECILIA; PODEROSO, JUAN JOSÉ

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas

Las células de mamífero expresan proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPK) que integran efectos de señales extracelulares y desencadenan caminos de transducción con ac-

tivación de ERK1/2, p38 MAPK y JNKs. Estas señales determinan respuestas específicas vía MAPKs (proliferación, arresto del ciclo celular, apoptosis). Especies reactivas del oxígeno (ROS) son generadas durante el metabolismo oxidativo mitocondrial y han sido implicadas en el 'signaling' celular normal. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) promueve la fosforilación en tirosina de proteínas, incluyendo ERK1/2 y p38. La concentración de H_2O_2 en el estado estacionario ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ss}}$) depende de la velocidad de producción mitocondrial y su degradación citosólica por catalasa y glutatión peroxidasa; tejidos proliferantes (hígado y cerebro fetales) y tumorales presentan $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ss}}$ disminuido, y tejidos quiescentes (hígado adulto) exhiben $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ss}}$ dos órdenes de magnitud mayor. El objetivo del trabajo es estudiar la modulación que ejerce H_2O_2 a través de MAPKs sobre la progresión del ciclo celular en la línea tumoral LP07. Se observó que $1\mu\text{M}$ H_2O_2 promueve proliferación, y concentraciones mayores ($> 10\mu\text{M}$) arresto celular y apoptosis, con fosforilación diferencial de ERK1/2, p38 y JNK. A $1\mu\text{M}$ H_2O_2 , la cinética de activación de ERK es lenta y la señal persistente. En contraste, $50\mu\text{M}$ H_2O_2 induce activación rápida seguida de decaimiento; $1\mu\text{M}$ y $50\mu\text{M}$ H_2O_2 promueven síntesis e inhibición de ciclina D1, respectivamente. La inhibición de MEK1/2, anuló la inducción de ciclina D1 por $1\mu\text{M}$ H_2O_2 , indicando que la señal proliferativa es dependiente de ERK1/2. Asimismo, se observó un aumento de la fosforilación de ERK1/2 en las mitocondrias de LP07, sugiriendo que una translocación específica activa ERK1/2 en las organelas. Los resultados proponen que la proliferación tumoral persistente depende de actividad diferencial de las MAPKs debida a la menor concentración de H_2O_2 en las células transformadas.

474. (3671) INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA IN VIVO UTILIZANDO OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS ANTISENtido AL ARNm DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A LA INSULINA TIPO I (IGF-IR). SALATINO, MARIANA; SCHILLACI, ROXANA; PROIETTI, CECILIA J; CARNEVALE, ROMINA; CHARREAU, EDUARDO H; ELIZALDE, PATRICIA V

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Previamente demostramos que el IGF-IR juega un rol central en la proliferación in vitro de células del adenocarcinoma mamario murino progénesico-dependiente C4HD. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del bloqueo de la expresión del IGF-IR sobre el crecimiento in vivo del tumor C4HD utilizando una estrategia antisentido. Para ello utilizamos la administración intratumoral ($100\mu\text{g}/\text{día}/\text{ratón}$) o sistémica ($1\text{mg}/\text{día}/\text{ratón}$) de oligodeoxinucleótidos antisentido fosforilados al ARNm del IGF-IR (AS[S]ODN) durante 14 días. Como control se inyectaron ratones con [S]ODN sentido (S[S]ODN) o con $100\mu\text{l}$ PBS. El tratamiento intratumoral con el AS[S]ODN inhibió un 62.3 % y un 66.3 % el crecimiento tumoral con respecto a los controles (S[S]ODN y PBS respectivamente, $P < 0.001$) mientras que el sistémico inhibió un 62.0 % y un 66.0% respecto a los controles (S[S]ODN y PBS respectivamente, $P < 0.001$). El efecto antitumoral se debió a un mecanismo antisentido específico ya que la inhibición del crecimiento tumoral fue dosis-dependiente y no se observó efecto en ratones tratados con el S[S]ODN. En el día 15 se obtuvieron extractos proteicos de los tumores y se analizaron las vías de transducción de señales posiblemente afectadas por el bloqueo del IGF-IR. Los tumores de ratones tratados con AS[S]ODN mostraron, respecto de los controles, disminución en la expresión de IGF-IR y en la fosforilación del sustrato del receptor de insulina-1, inhibición de la activación de PI-3K/Akt, p42/p44MAPK y ErbB-2, mientras que la expresión y activación del receptor de progesterona no se afectó. Esta es la primera demostración que el crecimiento de cáncer de mama puede ser inhibido por la administración in vivo de AS[S]ODN al IGF-IR.

475. (3743) LA FOSFORILACIÓN DEL PRODUCTO DEL ONCOGÉN C-FOS POR MAPKS ACTIVABLES POR "ESTRÉS" CONTRIBUYE A LA ACTIVACIÓN DE AP-1. TANOS, TAMARA; MARINISSEN, MARIA JULIA;

HOCHBAUM, DANIEL; DOMAICA, CAROLINA; COLUCCIO, FEDERICO; GUTKIND, SILVIO; COSO, OMAR

Lab. Fisiología y Biología Molecular, FCEyN, UBA oral pharyngeal cancer branch, nidcr, nih

Las MAPK son proteínas mediadoras del pasaje de señales extracelulares al núcleo. Su acción sobre factores de transcripción determina cambios en la expresión génica en las células. Los factores de transcripción de la familia AP-1 (c-Jun, c-Fos, etc) se activan en forma temprana ante diversos estímulos externos. Un paso clave en los procesos de transactivación es la fosforilación por proteínas quinasas específicas, tal el caso de c-Jun y JNK. Si bien un mecanismo regulatorio análogo podría operar sobre c-Fos, este no se conoce bien aún. Utilizando un sistema de doble-híbrido encontramos interacción física entre c-Fos y p38g. Estudiamos las consecuencias bioquímicas de dicha interacción extendiéndolo a todos los miembros de la familia p38 y a JNK (SAPKs). Vimos que todas las SAPKs fosforilan c-Fos in vitro e in vivo, con la excepción de JNK. Ensayos con el sistema de expresión génica de GAL4 mostraron que la fosforilación de un recombinante GAL4-c-Fos aumenta su capacidad de activar la transcripción. Además, la sobre-expresión conjunta de c-Fos con miembros de la familia p38 resulta en la activación de elementos TRE. Una batería de mutantes puntuales en serinas o treoninas muestran que el sitio blanco de fosforilación por las p38 no sería único. También observamos que la fosforilación por las distintas p38s llevan a una respuesta diferencial de c-Fos, por ejemplo, la fosforilación de c-Fos mediada por p38d no sería determinante de su actividad como factor de transcripción. Por último vemos que c-Fos contribuye a la respuesta AP-1 a agentes que inducen daños en la célula como la radiación UV. En este trabajo mostramos que la fosforilación de c-Fos por las MAPKs p38 contribuye a la regulación transcripcional inducida por AP-1 de modo similar a lo que ocurre con c-Jun y JNK.

476. (3768) LA SOBREENPRESIÓN DE PKCZ Y DE MUTANTES CON ACTIVIDAD QUINASA ALTERAN EL COMPORTAMIENTO CELULAR Y AUMENTAN LA SECRECIÓN DE PROTEASAS MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA ERK. URTREGER, ALEJANDRO; GROSSONI, VALERIA; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA

Instituto de Oncología "A. H. Roffo"

Las PKCs constituyen una familia de serin-treonin quinasas que controlan procesos celulares tales como el crecimiento, la diferenciación y la transformación maligna. Anteriormente transfectamos la línea NMuMG (glándula mamaria murina normal) con PKCz y las mutantes Ps, Zn, V3 (región regulatoria alterada) y Reg (sin actividad catalítica), con el fin de determinar el rol de cada dominio en el comportamiento celular. La expresión de PKCz indujo un aumento en el número de células a las 24 hs ($2,86 \times 105 \pm 0,6 \times 10(4)$ vs $1,43 \times 105 \pm 1,1 \times 10(4)$), una mayor clonogenicidad ($29,7 \pm 3\%$ vs $18,4 \pm 5\%$) y un incremento en los niveles de uroquinasa secretados ($1,98 \pm 0,18$ vs $0,93 \pm 0,002$ UI/mg prot/24 hs) respecto de las células control ($p < 0,05$). La inhibición de la vía de señalización MEK-ERK, con PD98059 (50mM), revirtió estos efectos hasta los valores del control. Las células transfectadas con las mutantes Ps, Zn y V3 con actividad catalítica, pero no las células control o Reg, presentaron activación constitutiva de la vía ERK. Ps, Zn y V3, al igual que la PKCz wt, mostraron un aumento significativo en sus capacidades adhesiva, de extensión sobre sustrato e invasiva (1,5 a 2 veces respecto del control, $p < 0,05$) mientras que su capacidad migratoria se redujo a la mitad ($p < 0,05$). Además Ps, Zn y V3 incrementaron significativamente la secreción de uroquinasa y MMP-9 (2 a 4 veces respecto del control, $p < 0,05$), pero no alteraron la secreción de MMP-2 ni MMP-3. Nuestros resultados sugieren que la modulación del comportamiento de las células NMuMG y de la secreción específica de algunas proteasas inducida por PKCz sería dependiente de la presencia de su dominio catalítico activo. Estos fenómenos se asociarían con la activación de la vía de señalización MEK-ERK.

477. (3780) OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO DE RECEPTORES DE PROGESTERONA (ASRP) INHIBEN EL CRECIMIENTO DE CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS IN VIVO. ROL DEL ESTROMA EN EL CRECIMIENTO PROGESTÁGENO-INDEPENDIENTE (PI). LAMB, CAROLINE A.; HELGUERO, LUISA A.; VANZULLI, SILVIA; MOLINOLO, ALFREDO A.; LANARI, CLAUDIA

no Instituto de Biología y Medicina Experimental

En trabajos previos demostramos que el bFGF estimula la proliferación celular de un tumor progestágeno-dependiente (PD) y ésta disminuye al bloquear los receptores de progesterona (RP). Postulamos que el estroma tumoral juega un rol activo en el crecimiento tumoral PI vía RP. Los objetivos fueron investigar: a) el rol de fibroblastos estromales (FB) en el crecimiento tumoral, b) la expresión de bFGF en FB de tumores PD y PI, c) la activación de RP por bFGF, d) el rol de asRP en el crecimiento tumoral PI in vivo. Se realizaron ensayos de co-cultivo con células epiteliales (EPI) y FB provenientes de tumores PD o PI. Los FB PI fueron más estimuladores que los PD al ser cultivados junto con EPI PD o PI (Ej: FB PD+EPI PD: 650 ± 163 cpm; FB PI+EPI PD: 1891 ± 100 cpm; $p < 0.001$). El bFGF estimuló la proliferación celular de cultivos EPI PI ($p < 0.001$). El Western blot de FB PI reveló una mayor expresión de la isoforma de 16 kDa de bFGF que en los FB PD (Intensidad relativa: FB PD: 1; FB PI: 2.11 ± 0.18 ; $p < 0.05$). El Mobility Gel Shift reveló que el bFGF activa el RP en EPI PD y que éste también se encuentra activado en el tumor PI. El tratamiento con asRP (0.8 mg/8 hs, ip por 5 días, $n=4$) inhibió significativamente el crecimiento tumoral PI ($p < 0.05$). Esto correlacionó con signos histológicos de regresión, una disminución del índice mitótico (bromodeoxiuridina) y en expresión de RP y un aumento en la apoptosis (TUNEL). No hubo diferencias en ratones tratados con oligonucleótidos control o placebo. Un estado de estro/metaestro continuo se observó en ratones tratados con asRP o antiprogestágenos. Postulamos que el bFGF podría ser un factor estromal responsable de la activación de los RP en el crecimiento PI, confirmándose el papel de los RP como mediadores del crecimiento PI.

478. (3880) LOS ESTRÓGENOS CONTROLAN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE TUMOR MAMARIO A TRAVÉS DE COMPLEJOS CONTENIENDO NF-KB, EL COACTIVADOR RAC3 Y RECEPTOR DE ESTRÓGENOS. RUBIO, MARÍA FERNANDA; WERBAJH, SANTIAGO; NOJEK BARBIERI, IGNACIO; CÔLO, GEORGINA; KELLER, ELIZABETH; NAHMOD, VICTOR; COSTAS, MONICA

Instituto de Investigaciones Médicas "Dr Lanari" Lab de Biol Molec. y Apoptosis, Dep. de Sust Vasoactivas, Inst de Invest Médicas Lanari UBA-CONICET

Los coactivadores de receptores nucleares de la familia p160 han sido descriptos por aumentar la transcripción de receptores nucleares, y hemos demostrado previamente que son capaces de aumentar la actividad del factor de transcripción NF-kB. El coactivador RAC3 se encuentra sobreexpresado en tumores mamarios y está involucrado en la actividad proliferativa de los estrógenos. Investigamos el rol de RAC3 y NF-kB, sobre la proliferación de la línea tumoral mamaria de ducto T47-D, ER positiva. Encontramos que, la citoquina TNF-alfa activadora de NF-kB, induce un aumento en la proliferación ($12336,2 \pm 487,7$ cpm, $p < 0.001$ respecto basal), que se bloquea por el inhibidor de NF-kB sulfasalazina ($5271 \pm 760,1$ cpm, $p < 0,001$ respecto TNF-alfa). Esta correlaciona con la expresión de Ciclina D1 (Western blot). La acción proliferativa de 17-beta-estradiol también fue inhibida significativamente por sulfasalazina ($4679,1 \pm 784,1$ cpm, $p < 0,001$ respecto estradiol: $9481,47 \pm 375,53$ cpm), indicando que ER activado requiere de la actividad NF-kB y no existe un antagonismo entre ambas vías estimuladoras, lo cual fue confirmado por EMSA. Por ensayos de coimmunoprecipitación y Western blot determinamos que ER, NF-kB y el coactivador RAC3 forman parte del mismo complejo, el cual estaría involucrado en el control de

la expresión de Ciclina D1 muy probablemente a través de elementos kB, dada la ausencia de elementos específicos respondedores a estrógenos en el promotor de este gen. Se concluye que la sobreexpresión del coactivador RAC3 estaría contribuyendo en la acción mitogénica de NF-kB. La cual es requerida para la acción proliferativa de los estrógenos. Estos resultados contribuyen al conocimiento para el diseño de nuevas terapias alternativas al uso de hormonas en el tratamiento de cáncer de mama

479. (3978) EL TRATAMIENTO CON ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES REDUCE LA PROGRESIÓN TUMORAL Y EL DESARROLLO DE SÍNDROMES PARANEOPLÁSICOS DE UN ADENOCARCINOMA DE PULMÓN MURINO. PELUFFO, GUILLERMO; STILLITANI, ISABEL; RODRÍGUEZ, VANINA; *URTREGER, ALEJANDRO; KLEIN, SLOBODANKA; DIAMENT, MIRIAM

*Instituto de Oncología A. H. Roffo Dpto Bioterio y Cáncer Experimental, * Dpto de Biología Celular, Area Investigación, IOAHR*

El crecimiento tumoral es frecuentemente acompañado de una respuesta inflamatoria sistémica, la cual favorece el desarrollo neoplásico y la expresión de síndromes paraneoplásicos. Los AINEs se han utilizado en el tratamiento del cáncer en distintos modelos experimentales y en pacientes. Ejercen su efecto antitumoral principalmente por inhibición de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), la cual es sobreexpresada en distintos tumores humanos y murinos, entre ellos de pulmón. Esta patología es frecuentemente acompañada por síndromes paraneoplásicos como caquexia y leucocitosis. Portadores del tumor de pulmón murino LP07, desarrollan tales síndromes paraneoplásicos. Los tratamientos de portadores LP07 con indometacina (Indo, 10µg/ml) y celecoxib (Cxb, 1500ppm) redujeron el crecimiento del tumor primario (P<0.001) y el número de metástasis pulmonares (P<0.05 y 0.001 respectivamente); inhibieron la pérdida de peso corporal (P<0.05 y 0.01) y la leucocitosis (P<0.01 y 0.05). El tratamiento con Indo redujo los niveles séricos de IL1β e IL6, conocidos mediadores de la caquexia. El tratamiento in vitro con Indo y Cxb (10µM) disminuyó la invasividad y la migración (P<0.05) de las células LP07 y redujo la actividad de MMP-9 en medios condicionados. La actividad de uPA sólo fue inhibida con Cxb (25µM). Indo 50µM y Cxb 25µM disminuyeron la viabilidad de células LP07 in vitro, aumentando el número de células apoptóticas. Indo y Cxb (10µM) inhibieron la respuesta angiogénica inducida por células LP07 tratadas in vitro con ambos AINEs (P<0.01 y 0.05). Asimismo se incrementó la citotoxicidad de linfocitos esplénicos provenientes de portadores de tumor tratados con Indo (10µg/ml) sobre células LP07 (P<0.05). Los resultados obtenidos indican la potencialidad del tratamiento con AINEs tanto en lo referente a la progresión tumoral como a los síndromes paraneoplásicos.

480. (4041) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DEL RIGF-I ASOCIADOS A LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA EN LA CARCINOGENESIS MAMARIA. COCCA, CLAUDIA¹; GUTIERREZ, ALICIA¹; CROCI, MAXIMO²; NUÑEZ, MARIEL¹; MEDINA, VANINA¹; MARTIN, GABRIELA¹; CRICCO, GABRIELA¹; MOHAMAD, NORA¹; RIVERA, ELENA¹; BERGOC, ROSA¹

¹Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA ²Instituto de Inmuno Oncología. Buenos Aires, Argentina.

En trabajos previos caracterizamos extensamente un tumor mamario inducido en rata por inyección intraperitoneal de tres dosis del cancerígeno N-Nitroso-N-Metilurea (NMU). El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión del receptor a factor de crecimiento insulínico tipo-I (RIGF-I) en tejido mamario de ratas inyectadas con NMU a lo largo de las etapas de la carcinogénesis y en tumores ya desarrollados y con respuestas opuestas frente

a la ovariectomía. Para ello analizamos muestras de tejido mamario tomadas en las distintas fases de iniciación/promoción/progresión tumoral, de tumores de ratas control (NMU/c), de tumores que continuaron creciendo después de la ovariectomía (HI) y de tumores que regresaron (HD). La expresión de RIGF-I se analizó por inmunohistoquímica y la determinación del número de sitios (Q) y la Constante de disociación (Kd) se efectuó mediante ensayos de autodesplazamiento. Los valores de Q (fmol/mg.prot.) obtenidos para tumores NMU/c fueron 205,8±30,9; para los HI fueron variables en un rango de 0 (40%) hasta 415 (en los más indiferenciados) y para los HD indetectables. El valor de Kd para todos los grupos fue de 7,2±2,4 nM. En los cortes de tejido mamario extraídos a lo largo del período de carcinogénesis, observamos un temprano incremento de la expresión de RIGF-I en las células epiteliales de mama de ratas inyectadas con NMU respecto a las no inyectadas. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que hemos caracterizado el RIGF-I en los tumores mamaros NMU-inducidos y demostrado que su expresión está regulada fuertemente por estrógenos. Por otra parte, demostramos que RIGF-I se expresa tempranamente en la carcinogénesis mamaria, lo que podría estar facilitando el establecimiento de un loop de malignidad/antiapoptosis/proliferación.

PREMIO CHERNY

En virtud de que serán pre-seleccionados por los Jurados 6 postulantes para concursar por los respectivos Premios en las sesiones dedicadas a los mismos, los inscriptos no seleccionados, presentarán sus trabajos en las sesiones de sus áreas temáticas correspondientes.

481. (3383) ACTIVIDAD FOTODINÁMICA DE UNA NUEVA PORFIRINA CATIONICA (CP) Y SUS CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS IN VIVO E IN VITRO. ALVAREZ, MARIA GABRIELA; PRINCIPE, FERNANDO; RUMIE VITTAR, N. BELÉN; ROMANINI, SILVIA; DURANTINI, EDGARDO; BERTUZZI, MABEL; RIVAROLA, VIVIANA

Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas Fco. Qcas y Naturales Orientación Fisiología Animal, Dpto de Química, Dpto Patología Animal. Univ. Nac. de Rio Cuarto

La Terapia Fotodinámica (TFD) constituye una modalidad terapéutica para el tratamiento de tumores sólidos superficiales. Esta terapia se basa en la acumulación de un fotosensibilizador en los tejidos neoplásicos, seguida por la irradiación con luz en presencia de oxígeno. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar los efectos de la una nueva porfirina cationica (CP) sobre cultivos de células de laringo carcinoma humano (Hep-2) y en ratones Balb-c. Los ensayos de índice de supervivencia (por MTT) han permitido comprobar que en oscuridad CP (0,1, 1 y 10 µM) no afecta la viabilidad celular. Sin embargo, la acción combinada de CP y luz visible induce una disminución significativa del 80% de la supervivencia celular. Por tinción con Hoechst 33258 se encontró que CP e irradiación (20 J/cm²) induce el máximo valor de índice apoptótico (67%) con respecto al total de muerte. Los estudios de localización demostraron que la droga se ubica en mitocondria. Estudios farmacocinéticos in vivo indicaron que el fotosensibilizador se acumula preferencialmente en hígado e intestino, mientras que fue insignificante la cantidad encontrada en cerebro y piel. Los cortes histológicos (H/E) mostraron ausencia de daños relevantes en hígado, bazo y riñón. Por estudios fototerapéuticos se determinó el volumen de tumores tratados con CP e irradiados. Se observó una regresión del 90% del volumen de los tumores inyectados a los 7 días post irradiación. Se concluye que CP es un interesante fotosensibilizador para la Terapia Fotodinámica, debido a la alta mortalidad que induce en las células irradiadas respecto a los controles en oscuridad, a que produce apoptosis, a que no se manifiestan signos de toxicidad en animales y a su capacidad de producir regresión en el volumen de tumores de ratones.

482. (3594) SEROTONINA PROTEGE A LOS RECEPTORES TIPO 1 (RECEPTORES A MINERALOCORTICOIDES) RE-NALES DE LA OCUPACIÓN PATOLÓGICA POR GLUCOCORTICOIDES ESTIMULANDO IN SITU, A LA 11 β HIDROXIESTEROIDE-DESHIDROGENASA 2. ZALLOCCI, MARISA; RUMILLE, SANDRA; CALVO, JUAN CARLOS; LANTOS, CARLOS; DAMASCO, MARÍA CRISTINA; MATKOVIC, LAURA

Lab. Esteroides - Dpto. Química Biológica - FCEyN - UBA y PRHOM-CONICET

Serotonina (5HT), bioamina de amplia distribución, se libera como neurotransmisor en discretas brechas sinápticas, pero también como neuromodulador en varicosidades de "swelling" axonal, a partir de las cuales puede difundir hacia células-blanco extraneuronales. La 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (HSD2) confiere especificidad tisular (sobre todo renal) a aldosterona, evitando ocupación del receptor a mineralocorticoides (MR) por exceso de glucocorticoides (GC) igualmente afines. Células MDCK, de riñón distal de perro, fueron incubadas con corticosterona (B) tritiada, con o sin 5HT, la 11-dehidrocortico-sterona (A) formada detectada por HPLC, y su radiactividad cotada por centelleo previa exclusión cromatográfica de otros metabolitos. En MDCK se encontró actividad HSD2 NAD(+)-dependiente, con un Km de 12.5 \pm 0.8 nM y una Vmax de 11 \pm 1 fmol de A/mg proteína min. Carbenoxolona inhibió esta actividad con un IC[50] de 50nM, coincidiendo estas características con las publicadas para la HSD2. 2nM y 20pM –pero no concentraciones intermedias- de 5HT estimularon la actividad HSD2 al triple. Antagonistas específicos de 5HT[1] y 5HT[2] bloquearon esta activación. Noradrenalina –neurotransmisor "puro"-, de importante presencia y actividad electrofisiológica en riñón, no activó HSD2 en este sistema. Con estos resultados, y anteriores, se postula un nuevo circuito regulatorio en el que participan GC, 5HT, y posiblemente otras neurohormonas. a) El estrés aumenta la síntesis de GC y la de 5HT tanto adrenal como extraadrenal. b) La 5HT es captada a nivel renal. c) Allí activa la HSD2. d) inactivando así biológicamente el exceso de GC, evitando sus efectos agonistas sobre los MR los cuales potenciarían los efectos sodiorretentores, de expansión de volumen e hipertensores.

483. (3606) PARTICIPACION DIFERENCIAL DEL SISTEMA DEPENDIENTE DE FOSFATIDIL INOSITOL 3 KINASA PROTEINA KINASA B (PI3K/PKB) ESTIMULADO POR FSH E IGF-I EN LA REGULACION FUNCIONAL DE LA CELULA DE SERTOLI (CS). RIERA, FERNANDA; MERONI, SILVINA; PELLIZZARI, ELIANA; GALARDO, NOEL; CIGORRAGA, SELVA

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños R.Gutiérrez

FSH e IGF-I estimulan las mismas respuestas metabólicas en CS. Ambas hormonas difieren marcadamente en el tipo de receptor que utilizan. Demostramos previamente que en CS FSH activa PI3K/pkB y en el presente trabajo que también lo hace IGF-I. El objetivo de este trabajo fue analizar si la activación de un sistema de señales particular puede asociarse unívocamente con una respuesta biológica. Cultivos de CS de ratas de 20 días fueron estimulados con FSH (100ng/ml) o IGF-I (50ng/ml) en ausencia o presencia de un inhibidor de PI3K, wortmanina (W, 100nM). Se analizó por Western blot la fosforilación de pKB (P-pKB). Se observó que FSH e IGF-I estimulan los niveles de P-pKB (15, 30 y 60 min) y que W inhibe el estímulo. Se analizaron: la producción de transferrina (TRF) y lactato (L), la incorporación de glucosa y la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH). Los resultados se expresan como media \pm DS, n=3 (distintas letras indican los grupos con diferencias significativas, p<0.05). Se observó que W inhibe la incorporación de glucosa estimulada por FSH e IGF-I (B:776 \pm 127a; FSH:1521 \pm 80b; FSH+W:960 \pm 95a; IGF-I:1552 \pm 70b; IGF-I+W:915 \pm 50a, dpm/ μ gADN). Asimismo, W inhibe TRF, L y LDH estimulados por FSH pero no por IGF-I (TRF, B:39 \pm 5a;

FSH:109 \pm 10b; FSH+W:62 \pm 6c; IGF-I:61 \pm 6c; IGF-I+W:59 \pm 5c, ng/ μ gADN), (L, B:6.2 \pm 0.3a; FSH:14.2 \pm 0.8b; FSH+W:9.0 \pm 0.5c; IGF-I:12.8 \pm 0.7b; IGF-I+W:12.6 \pm 0.9b, μ g/ μ gADN) (LDH, B:22 \pm 2a; FSH:41 \pm 4b; FSH+W:31 \pm 3c; IGF-I:31 \pm 4c; IGF-I+W:32 \pm 4c, mUI/ μ gADN). Los resultados obtenidos demuestran que la activación de PI3K/pkB está unívocamente relacionada con la regulación de la entrada de glucosa a la célula. Sin embargo, la activación de esta vía está involucrada en los efectos de FSH sobre L, LDH y TRF pero no en los de IGF-I y señalan la importancia de considerar en forma individual las distintas respuestas biológicas y los sistemas de señales activados por diferentes hormonas.

484. (3786) LA DISFUNCION ENDOTELIAL, LA HIPERCOLESTEROLEMIA Y LA SOBRECARGA SALINA NO SON FACTORES SUFICIENTES PARA INDUCIR HIPERTENSION ARTERIAL. FIORE, MARIA CECILIA; MARTÍN, FERNANDO L; BAIGORRIA, SANDRA T; GARCÍA, NÉSTOR H; JUNCOS, LUIS I

Instituto privado de Especialidades Médicas SA-CONICET-

La disfunción endotelial es una característica esencial de la hipertensión, así como la sal sensibilidad. La Hipercolesterolemia induce una serie de cambios renales como inflamación, proliferación y esclerosis glomerular, que se manifiestan como disfunción endotelial. Por ello nuestro objetivo fue evaluar si en condiciones de disfunción endotelial inducida por hipercolesterolemia, la sobrecarga salina puede generar aumento de la tensión arterial. Para ello, ratas Wistar entre 190-240 g fueron evaluadas durante 45 días; los animales se dividieron en los siguientes grupos: dieta alta en colesterol (2%)(DAC), DAC y alta en sodio (4%) (DAC+DANa), dieta standard (Control). La tensión arterial, colesterolemia, natriuresis, proteinuria y el filtrado glomerular fueron evaluados. La disfunción endotelial fue evaluada en base al aumento de flujo plasmático renal (FPR) inducido por la administración intra-arteria renal de acetilcolina. La colesterolemia aumentó con la dieta alta en colesterol vs el control. Esto se asoció con un incremento en la proteinuria (DAC 12.61 \pm 3.89 mg/24 hs y DAC+DANa 15.5 \pm 1.6 mg/24 hs vs el Control 6.3 \pm 2.6 mg/24 hs, p<0.05 para ambos). La natriuresis aumentó en el grupo DAC+DANa. En ratas con DAC el FPR aumentó un 9.9 \pm 3.8 % y en DAC+DANa un 13.9 \pm 3.9%, mientras que en el grupo control fue un 25.5 \pm 3.5% (p<0.05 para ambos), sugiriendo una menor liberación de óxido nítrico (y posiblemente prostaglandinas) del endotelio, lo cual sostiene que la hipercolesterolemia causa disfunción endotelial. Sorprendentemente, luego de 45 días de hipercolesterolemia y disfunción endotelial, la sobrecarga salina no fue suficiente para afectar la tensión arterial (p=0.76, ANOVA). En nuestro modelo de hipercolesterolemia asociada a disfunción endotelial y glomerular la sobrecarga salina no es suficiente para aumentar la Tensión Arterial. Factores adicionales son necesarios para inducir hipertensión arterial.

485. (3843) LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE NF-KB ES DIFERENCIALMENTE REGULADA POR DOMINIOS ESPECÍFICOS DEL COACTIVADOR TIF2 CON DISTINTAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ASOCIADAS. NOJEK, IM; WERBAJH, SE; COLÓ, GP; RUBIO, MF; FRANCO, L; NAHMOD, VE; COSTAS, MA

Instituto de Investigaciones Médicas Lanari-UBA Fundación Instituto Leloir; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA

Hemos demostrado previamente que la sobreexpresión de coactivadores de receptores nucleares aumenta la actividad NF- κ B en forma dosis dependiente. Con el objeto de estudiar el papel del complejo general coactivador y los componentes que regulan la actividad de NF- κ B analizamos por transfecciones con distintas delecciones del coactivador TIF-2, ensayos reporter, traducción in vitro de proteínas y ensayos de precipitación de proteínas asociadas a una matriz todas las posibles interacciones

entre el coactivador y las quinasas involucradas en la activación de NF- κ B. Observamos que: 1) el inhibidor específico de p38 MAPK disminuye al 50 % la actividad transcripcional de NF- κ B, aún en células que sobreexpresan distintas delecciones de TIF2 2) TIF2 es sustrato de un complejo que contiene a p38 MAPK 3) existe interacción física de TIF2 con p38 MAPK y RelA determinada a través de ensayos de unión con proteína traducida in vitro y 3) a través de ensayos de unión con extractos proteicos de HEK 293 estimuladas o no con TNF- α 20 ng/ml existe interacción física de TIF2 con IKK, con una preponderancia al dominio carboxiterminal, e I κ B α , sólo en condiciones basales. Este complejo que contiene a NF- κ B regula su actividad determinando nivel de expresión de genes blanco de este factor de transcripción, dependiendo del contenido del complejo coactivador. Estas observaciones resultarían relevantes para el conocimiento del control de la expresión génica en tumores que sobreexpresan coactivador.

486. (3853) NUEVO METODO DE ANALISIS POR IMAGENES AUTOMATIZADO PARA LA CUANTIFICACION DE FIBROSIS HEPÁTICA. CASTAÑO, G; FERNANDEZ, ALEJANDRA; SOOKOIAN, SILVIA; PARISSI COLOMA, AMANTE M; ROSELLO, D; PACHADO, J; ZUNINO, S; LEMBERG, A; PERAZZO, J

Fisiopatología, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA Lab. Hepatología, Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Antecedentes: la evaluación histopatológica de la fibrosis hepática, componente importante de varias hepatopatías se realiza mediante métodos semicuantitativos (score). Objetivo del presente trabajo es desarrollar un nuevo método basado en el análisis de imágenes automatizado para la cuantificación de fibrosis hepática. Material y Método: se utilizaron 40 biopsias hepáticas, de pacientes con Hepatitis C (HVC), fijadas en formol-buffer, incluidas en parafina y teñidas con coloraciones de rutina. Se utilizó el score de Ishak para el diagnóstico histopatológico y la estadificación de la HVC, observándose: 15 biopsias en estadio 0; 11 en estadio 1-2; 8 en estadio 3-4 y 6 en estadio 5-6. Los cortes teñidos con reticulina se usaron con el método propuesto: se tomaron 3 imágenes de cada biopsia, correspondientes a: área portal-periportal/septal; área de la vena centrolobulillar y área del lobulillo hepático. Las imágenes fueron capturadas (Cap View), digitalizadas (ACDSee v 3.1) y normalizadas (Adobe Photoshop 7.0). El área de reticulina fue seleccionada, aislada en una nueva imagen, medida (Scion Image Beta 4.0.2) y expresada en píxeles /pulgadas(2). La cuantificación para cada biopsia fue obtenida como la media de las tres imágenes (Media \pm SD). La estadística se realizó usando el test de ANOVA & Bonferroni. Los resultados fueron: estadio 0: 0.34 \pm 0.07; estadio 1-2: 1.32 \pm 0.05; estadio 3-4: 2.64 \pm 0.4 y estadio 5-6: 4.55 \pm 0.4 (diferencia entre los estadios estadísticamente significativa). La correlación con el Score de Ishak fue 0.89 (p < 0.0000), validándose intra y extraoperador. Conclusiones: Este método ofrece una sensible, objetiva y rápida cuantificación automática de la fibrosis y de cualquier estructura tisular diferencialmente identificable. Los estadios reagrupados, son de una precisión muy superior a los grados usados hasta hoy. El presente método identifica específicamente (no usando el thresholding) otorgándole objetividad y precisión.

487. (3862) ATENUACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DE LA SEÑAL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESAN GH. MIQUET, JOHANNA GABRIELA; SOTELO, ANA INÉS; TURYN, DANIEL

Dpto. Química Biológica-IQUIFIB, Fac Farmacia y Bioquímica, UBA

La hormona de crecimiento (GH) se utiliza en dosis suprafisiológicas en algunas de sus aplicaciones terapéuticas

pero estos usos son controvertidos. Por esta razón, es importante estudiar el efecto que provocan altas concentraciones de GH a nivel intracelular. Con este propósito se estudia la regulación de la traducción de la señal de la hormona de crecimiento en ratones transgénicos que sobreexpresan GH. La GH actúa por unión a un receptor de membrana (GHR) asociado a una tirosín-quinasa (JAK2), que fosforila a varios mediadores intracelulares. Los más relevantes son los transductores de la señal y activadores de la transcripción (STAT) 5a y 5b. La activación de fosfatasa y la expresión de supresores de la señal de citoquinas -SOCS/CIS- son algunos de los mecanismos implicados en la finalización de la señal. Mediante inmunoprecipitación y Western Blot se evaluaron estos mediadores de señal. En los ratones transgénicos la concentración de GHR es aproximadamente tres veces mayor que en los controles. Sin embargo, ni la concentración de JAK2 ni su fosforilación aumentan. STAT 5a y 5b no son activados frente a un estímulo con GH, a pesar de que en la fracción microsomal la cantidad de SH2BB, un activador de JAK2, es 13,5 veces superior. CIS compete con STAT5 por su unión al receptor. Su contenido total es 6,8 veces mayor al de los ratones normales, mientras que su asociación a membranas es 3,5 veces superior. Por otro lado, la cantidad de fosfatasa SHP-2 asociada a membranas es 4,5 veces mayor, aunque su contenido total no varía. En conclusión, frente a un exceso de hormona de crecimiento se aprecia una desensibilización de la traducción de la señal de GH que se relaciona con un aumento de la proteína supresora CIS y con un mayor reclutamiento de fosfatasa a membranas.

488. (3877) LA INTERFERENCIA POR RNA MUESTRA QUE EN LA OBESIDAD, LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROFINA ELEVA LA PRESION ARTERIAL Y REGULA EL PESO CORPORAL. LANDA, MARÍA SILVIA; SCHUMAN, MARIANO; BURGUEÑO, ADRIANA; GEMA, CAROLINA; ALVAREZ, AZUCENA LAURA; GARCÍA, SILVIA INÉS; PIROLA, CARLOS JOSÉ

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, UBA.

La TRH diencefálica participa de la regulación de la presión (PA) y del balance energético. Recientemente mostramos que existe una interacción entre la TRH y la Leptina. En la hipertensión inducida por obesidad (HIO), un antisense contra TRH (100ug) normaliza la PA. Este trabajo utilizó el mismo modelo de obesidad (dieta con 40% grasa vacuna, 45 d) en 20 ratas Wistar macho vs 20 controles (C) con dieta standard para estudiar la participación de la TRH en la HIO. Se compararon los animales C con HIO, divididos en 2 subgrupos c/u tratados icv (5ul) con 0.5 ug de dsRNA fragmentado con DICER (iRNA) a partir del cDNA del preTRH (iRNA-TRH) ó la GFP como control (iRNA-GFP). Desde el día 1 hasta el 28, la iRNA-TRH: 1- disminuyó la TRH diencefálica (RIA, p<0.04) y el mRNA del preTRH (ensayo de protección de la ribonucleasa, p<0.01), 2- normalizó la PA (pletismografía de la cola, p<0.04) que está elevada en este modelo y 3- aumentó la ganancia de peso corporal (PC) (p<0.003), en forma independiente de la T3 y T4 (tabla, media \pm DS, n=4, ANOVA).

Grupos	TRH (pg/mg proteína)(mmHg)	PA (mmHg)	PC (g)	T3 (ng/ml)	T4 (ug/dl)
C + iRNA-TRH	367 \pm 63	118 \pm 8	397 \pm 25	1.1 \pm 0.1	4.6 \pm 0.8
C + iRNA-GFP	428 \pm 96	118 \pm 4	375 \pm 7	1.1 \pm 0.1	4.1 \pm 0.6
HIO + iRNA-TRH	584 \pm 112	126 \pm 11	433 \pm 27	1.2 \pm 0.1	4.3 \pm 0.7
HIO + iRNA-GFP	791 \pm 175	143 \pm 6	393 \pm 29	1.2 \pm 0.2	3.8 \pm 0.7

A través de un modelo sencillo de obesidad en la rata se demuestra que la TRH participa de la HIO contrarrestando la ganancia de peso. Además, mostramos que la iRNA es un método potente para inhibir, in vivo y en forma prolongada, la expresión de genes en mamíferos, lo que podría convertirla en una herramienta útil en terapia génica.

489. (3933) DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE DESCARGAS INTERICTALES DEL EEG USANDO MODELOS COMPUTACIONALES DE DATA MINING. SILVA, WALTER; CAZAMAJOU, ENRIQUE; SCARPETTINI, MARCELO; VALENTI, PABLO; GIAGANTE, BRENDA; ODDO, SILVIA; CONSALVO, DAMIAN; AIZEMBERG, ARIEL; KOCHEN, SILVIA

Centro de Epilepsia del Hospital Ramos Mejía-CONICET-Facultad de Medicina UBA Facultad de Ciencias Exactas y Naturales U.B.A.

El objetivo fue detectar de manera automática descargas paroxísticas interictales epileptiformes (DPIE) a partir de señales de EEG intracerebral (SEEG) usando modelos computacionales de data mining (DM). Métodos: Se analizaron registros de (SEEG) de 4 pacientes con epilepsia parcial refractaria que necesitaron registro de SEEG crónico en la evaluación prequirúrgica. Los modelos de DM fueron desarrollados a partir de la teoría de árbol de decisiones y a la de clasificación estadística Bayesiana. El modelo fue aplicado a más de 48600 muestras de señales. El pre procesamiento de la señal de SEEG fue realizado aplicando la transformada rápida de Fourier con una ventana deslizante de 320 ms y además se utilizaron técnicas de Hamming/Hanning. Los resultados de detección de los algoritmos fueron confrontados con la detección de dos expertos en electroneurofisiología (E1, E2) quienes previamente realizaron el análisis y detección visual de las (DPIE). Posteriormente ambos resultados fueron confrontados y analizados por un tercer experto. Resultados: Los resultados obtenidos con los modelos de DM evidenciaron un amplio rango de porcentajes de detección adecuada y de falsos positivos. El 40% de los modelos de DM detectaron mejor al ser comparados con los resultados de E1, E2. El 75% de los modelos tuvo menor porcentaje de falsos positivos al ser comparados con E1 y casi de un 40% al ser comparados con E2. Conclusiones: El modelo computacional de DM puede ser una herramienta de suma utilidad para asistir a los expertos en el proceso de detección y cuantificación de DPIE de las señales de EEG, sobre todos en los registros prolongados (SEEG y Video EEG) necesarios en las evaluaciones prequirúrgicas. Además reduciría en forma significativa el tiempo de análisis.

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS POSTER

ENDOCRINOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN XII

490. (3237) NIVELES DE LEPTINA Y ÓXIDO NÍTRICO EN ISLOTES DE LANGERHANS DURANTE LA GESTA DE RATAS SANAS Y DIABÉTICAS. CAPOBIANCO, EVANGELINA; JAWERBAUM, ALICIA; WHITE, VERÓNICA; PUSTOVRH, CAROLINA; GONZÁLEZ, ÉLIDA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)

Durante la gestación los islotes pancreáticos presentan cambios que incluyen: aumento en la tasa de división celular y del tamaño de los islotes, e incremento en la síntesis de insulina. En la patología diabética existen anomalías en la adaptación del tejido pancreático a las exigencias metabólicas de la preñez. El óxido nítrico (NO) es mediador del daño pancreático inducido por la diabetes. La leptina (LPT) estimula la proliferación de células β pancreáticas. El objetivo del presente estudio es evaluar los niveles de LPT y NO en islotes aislados de ratas sanas (C) y diabéticas (D, obtenidas por administración neonatal de estreptozotocina, 100 mg/kg) durante la preñez y postparto. Resultados: Los niveles de nitratos/nitritos (metabolitos del NO, evaluados por reacción de Griess, nmol/mg) son mayores en D (0.6 ± 0.05 $p < 0.05$) en relación a C (0.3 ± 0.03) en animales no preñados al igual que en el postparto. Dichos niveles no se modifican en la gesta control, pero disminuyen en D (día 14: 48%

$p < 0.05$). Los niveles de LPT (evaluados por EIA, pg/ μ g) disminuyen durante la gesta C (día 14: 78% $p < 0.001$), patrón alterado en la gesta de animales diabéticos, donde se observa un incremento en sus niveles (día 14: 246% $p < 0.001$). Adiciones de LPT (30 ng/ml) al medio de incubación de islotes de ratas sanas disminuyen tanto los niveles de nitratos/nitritos (53% $p < 0.01$) como la actividad de la enzima NOS (pmol.min/mg prot) (radioconversión de arginina a citrulina, 23% $p < 0.05$). LPT disminuye la producción de NO en islotes pancreáticos, y dichos niveles varían durante la adaptación del páncreas a la preñez. En los animales diabéticos no preñados, los niveles de LPT se encuentran disminuidos y la producción de NO, agente mediador del daño pancreático inducido por esta patología, está aumentada. En este modelo de diabetes, el incremento de Leptina y la disminución de óxido nítrico en los islotes podría ser un mecanismo adaptativo y protector frente a las condiciones maternas anómalas.

491. (3242) REGULACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO PLACENTARIO POR 15DEOXI DELTA 12,14 PROSTAGLANDINA J[2] (15dPGJ[2]) A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE PPAR GAMA. CAPOBIANCO, EVANGELINA; JAWERBAUM, ALICIA; ROMANINI, MARÍA CRISTINA¹; WHITE, VERÓNICA; PUSTOVRH, CAROLINA; MUGNAINI, MARÍA TERESA¹; SOÑEZ, CARLOS¹; GONZÁLEZ, ÉLIDA

*Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)
1Cátedra de Biología Celular y Embriología General de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba*

La activación de receptor nuclear PPAR gama inhibe la producción de compuestos proinflamatorios como el óxido nítrico (NO). Nuestros estudios previos indican que 15dPGJ[2], agonista endógeno de PPAR gama, disminuye los niveles de NO en placentas de ratas diabéticas a término, tejido afectado por altos índices de estrés oxidativo. El objetivo de este trabajo es evaluar en placentas a término de ratas sanas (C) y diabéticas por administración neonatal de estreptozotocina (100mg/kg) (D): 1) Los niveles de 15dPGJ[2] (EIA); 2) La participación del receptor nuclear PPAR gama en la regulación de los niveles placentarios de NO (incubaciones tisulares en presencia de bis aril diglicil éter (BADGE)), antagonista de PPAR gama, y dosaje de nitratos/nitritos mediante reacción de Griess); 3) La existencia de daño tisular evidenciado por nitrosilación proteica (localización inmunohistoquímica). Resultados: A diferencia del control, la placenta diabética evidencia una intensa marcación con el anticuerpo antinitrotirosina, especialmente en el endotelio vascular y mesénquima del laberinto. Los niveles de nitratos/nitritos placentarios (nmol/mg) disminuyen en presencia de 15dPGJ[2] (C: 3.7 ± 0.2 ; C + PGJ[2]: 2.2 ± 0.2 $p < 0.001$) y se incrementan en presencia de BADGE (6.1 ± 0.5 $p < 0.001$). El contenido placentario de 15dPGJ[2] (pg/mg) es menor en D (1.05 ± 0.37) que en C (13.75 ± 2.7 $p < 0.001$). La placenta de rata diabética a término presenta daño inducido por peroxinitritos. La regulación negativa de 15dPGJ[2] sobre la producción de NO se ejercerá a través de la activación de PPAR gama. La disminución de los niveles de 15dPGJ[2] en la placenta diabética podría relacionarse con el daño placentario inducido por la interacción de elevados niveles de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en esta patología.

492. (3247) ACCIÓN INHIBITORIA DE LA LEPTINA SOBRE EL OVARIO DE RATA DURANTE EL PROCESO OVULATORIO. RICCI, ANALÍA; ROMAN, ERNESTO; MOHN, CLAUDIA; FALETTI, ALICIA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET; Dpto de Química Biológica, FCEyN, UBA

La leptina, proteína codificada por el gen de la obesidad y sintetizada principalmente por el tejido adiposo, además de regular el apetito y el gasto energético, parece intervenir directamente en la función ovárica. El propósito de este trabajo fue

estudiar el efecto directo de la leptina sobre el ovario de ratas durante la ovulación. Para ello utilizamos ratas inmaduras (26-28 días) tratadas con eCG/hCG para inducir su primera ovulación. En primer lugar determinamos los niveles de leptina endógena por radioinmunoensayo en el suero de estos animales a lo largo de la estimulación. Observamos que los niveles de leptina, expresados como ng/ml suero, se mantienen constantes después de la administración de eCG, pero son significativamente disminuidos por la hCG (0 hs=245±20, 4 hs post hCG=132±10, $p<0.001$). Debido a esta disminución durante el proceso ovulatorio, estudiamos el efecto in vivo e in vitro de distintas dosis de leptina exógena en ese período. La administración de 3 dosis de leptina (5µg c/u) durante el proceso ovulatorio disminuyó la tasa ovulatoria, determinada por el número de ovocitos presentes en oviductos, con respecto a los controles (C=34±3, L=21±2, $p<0.05$). Asimismo, el contenido ovárico de prostaglandina E (PGE) preovulatorio, determinado por radioinmunoensayo y expresado como pg PGE/mg tejido, estaba significativamente disminuido (C=529±50, L=267±16, $p<0.01$). Para corroborar estos resultados estudiamos el efecto in vitro de leptina sobre cultivo de ovarios de ratas estimuladas con gonadotropinas. La síntesis de PGE y la producción de nitritos (metabolito estable del óxido nítrico) se encontraban disminuidas en presencia de 100-500 ng de leptina/ml (PGE: C=421±55, L100=250±50, L300=230±35, L500=166±33, $p<0.05$; Nitritos: C=1.2±0.4, L100=0.30±0.07, L300=0.38±0.08, L500=0.25±0.03, expresado como µmol nitritos/mg tejido). Estos resultados revelan que altos niveles de leptina tienen un claro efecto inhibitorio sobre la función ovárica durante el proceso ovulatorio.

493. (3251) LEPTINA Y ÓXIDO NÍTRICO: ALTERACIONES EN LA PLACENTA DE PACIENTES SANAS, DIABÉTICAS GESTACIONALES Y DIABÉTICAS PREGESTACIONALES. WHITE, VERÓNICA; GONZALEZ, ELIDA; CAROLINA, PUSTOVRH; CAPOBIANCO, EVANGELINA; JAWERBAUM, ALICIA

CEFYBO

La patología diabética induce alteraciones en la estructura y función placentaria, alterando el flujo materno/fetal de nutrientes. El Óxido Nítrico (NO) es un potente dilatador de la vasculatura fetoplacentaria, pero en concentraciones elevadas induce daño tisular. Los niveles de leptina se incrementan a lo largo de la gesta, en parte debido a la importante producción placentaria. Objetivo: Dosar los niveles de leptina y evaluar su función moduladora sobre la generación de NO en tejido placentario de pacientes sanas (C), con diabetes gestacional (DG) y diabetes pregestacional (DPG). Metodología: En tejido placentario a término se dosan los niveles de leptina por EIA. Explantes placentarios se incuban durante 3 horas con o sin agregado de leptina (10 ng/ml) para luego evaluar los niveles de nitros/nitritos (índice de producción de NO, reacción de Griess). Resultados: La producción de leptina (pg/mg prot) está disminuida en DG (6±2, $p<0.05$) y en DPG (2±1 $p<0.02$ en relación a C (24±7). La producción de nitros/nitritos (nmol/mg prot) es elevada en DG (6±0.5 $p<0.05$) y más aún en DPG (9±0.9 $p<0.001$) con respecto al control (4±0.3). Adiciones de leptina incrementan los niveles de nitros/nitritos en C (50%, $p<0.01$) En la placenta de pacientes diabéticas existe una elevada producción de NO (alteración probablemente vinculada con el daño placentario), y niveles disminuidos de leptina, anomalía que podría estar relacionada con las anomalías funcionales y metabólicas tisulares. La leptina estimula la producción de NO en placenta de mujeres sanas, observándose alteraciones en dicho mecanismo regulatorio en la patología diabética.

494. (3466) EL OXIDO NITRICO MEDIA LA ACCIÓN DE LEPTINA SOBRE GN-RH MODIFICANDO LA LIBERACIÓN DE AMINOÁCIDOS HIPOTALÁMICOS DURANTE LA MADURACIÓN SEXUAL EN RATAS HEMBRA. REYNOSO, ROXANA; SZWARCFARB, BERTA; CARBONE, SILVIA;

PONZO, OSVALDO; CERRUTI, SILVANA; RONDINA, DORA; SCACCHI, PABLO; MOGUILEVSKY, JAIME

Dto. de Fisiología. Facultad de Medicina.UBA. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA.

El sistema de aminoácidos hipotalámicos (AA) y el óxido nítrico (NO) juegan un rol importante en la regulación de la neuro-Gn-RH. Estos podrían mediar la acción estimulante de leptina (L) sobre Gn-RH durante la maduración sexual. En el presente trabajo, se estudió el efecto de N-monometil L arginina (NMMA), inhibidor competitivo de la enzima óxido nítrico sintasa, sobre la liberación de Gn-RH y AA estimulada por L. Se incubaron fragmentos hipotalámicos de ratas hembra prepúberes (15 días) y peripúberes (30 días), en medio de Earle's, o medio conteniendo L 10(-13) M, NMMA 0.5 mM o L 10(-13) M + NMMA 0.5 mM. Se determinó en el medio de incubación la liberación de Gn-RH (pg/ml, método RIA), ácido gamma amino butírico (GABA) y ácido glutámico (GLU) (pmoles/100 µl medio, método HPLC). Resultados: En animales prepúberes y peripúberes L estimuló significativamente la liberación de Gn-RH (15 días: 2.5 ± 0.5 vs 6.0 ± 0.7, 30 días: 4.2 ± 0.3 vs 6.9 ± 0.7), $p<0.001$. NMMA no produjo diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados. L 10(-13) M + NMMA 0.5 mM disminuyó Gn-RH en ambas edades, (15 días: 6.0 ± 0.7 vs 4.3± 0.2, 30 días: 6.9 ± 0.7 vs 1.5 ± 0.2), $p<0.001$. En prepúberes L 10(-13) M+ NMMA 0.5 mM disminuyó significativamente tanto GABA como GLU (GABA: 717 ± 30 vs 277 ± 10, GLU: 1094 ± 90 vs 555 ± 110) $p<0.001$. En peripúberes L 10(-13) M + NMMA 0.5 mM aumentó GABA, (270 ± 18 vs 402 ± 19), $p<0.05$ y disminuyó GLU, (3002 ± 188 vs 1037 ± 70) $p<0.001$. Conclusiones: Estos resultados sugieren que la estimulación de la liberación de Gn-RH por Leptina estaría mediada por NO, el cual actuaría modificando la liberación de aminoácidos en forma diferencial durante el desarrollo puberal.

495. (3529) INSENSIBILIDAD A LA GHRELINA (GHR) EN CÉLULAS DE LEYDIG EN RATAS DURANTE EL AYUNO. SUESCUN, MARIA OLGA^{1,2}; GIOVAMBATTISTA, ANDRES^{1,2}; PIERMARÍA, JUDITH¹; SPINEDI, EDUARDO¹; CALANDRA, RICARDO SAUL^{1,2,3}

¹Instituto Multidisciplinario de Biología Celular CONICET-CICPBA ²Dto de Cs Biol, Fac Cs Exact UNLP; ³Instituto de Biología y Medicina Experimental CONICET

Es conocido que los trastornos alimenticios se asocian con disturbios en la función reproductiva. Recientemente, se ha demostrado en estudios in vitro, la presencia del receptor de GHR en testículo y efectos de GHR sobre la síntesis de testosterona (T), lo que indica un rol de este factor en la modulación de la actividad testicular. El propósito de este trabajo fue determinar la acción de la Ghr sobre la actividad esteroidogénica testicular en células de Leydig purificadas (CL), de ratas Fischer controles alimentadas ad libitum (CT) y ayunadas durante 96 hs (AY). El AY produjo un descenso significativo del peso corporal (de 301,16 ± 16,5 a 258,8 ± 15,8 g; $P<0,05$). Se evaluó el efecto de Ghr (1-100 nM) sobre la producción de (T) por CL de ambos grupos, en condiciones basales y post-hCG (0,1-10 ng/ml). La liberación de T por las CL-AY fue significativamente menor tanto en condiciones basales como post-hCG con respecto al grupo CL-CT (basal, AY: 0,54 ± 0,05 vs CT: 1,09 ± 0,06; y hCG 10 ng/ml AY: 5,40 ± 0,34 vs CT: 7,98 ± 0,30 ng/105 cel; $P<0,05$). Ninguna de las concentraciones de Ghr ensayadas modificó la secreción basal de T en CT; sin embargo, se observó un efecto inhibitorio de Ghr sobre la liberación de T post-hCG 10 ng/ml (100 nM Ghr: 6,04 ± 0,16; 10 nM Ghr: 5,98 ± 0,14; y 1 nM Ghr: 6,98 ± 0,20 vs 7,98 ± 0,30 ng/105 cel; $P<0,05$). Este efecto de Ghr no fue observado en CL-AY. Nuestros resultados indican que: 1) Ghr sería un modulador negativo de la actividad esteroidogénica testicular y 2) la refractariedad de CL a la Ghr durante el AY podría representar, entre otros, un mecanismo adaptativo de la función gonadal durante estados agudos de balance energético negativo. (Carrillo-Oñativia 02/03 y PICT 5191/99)

496. (3639) EXPRESIÓN DE LA ENZIMA HEMO OXIGENASA (HO) EN CÉLULAS DE LEYDIG DE RATAS ADULTAS Y EN CÉLULAS DE LEYDIG TUMORALES MA-10. RECHE, CECILIA; GRION, NATALIA; MONDILLO, CAROLINA; PATRIGNANI, ZORAIDA; CYMERYNG, CORA; PIGNATARO, OMAR

Instituto de Biología y Medicina Experimental Lab. de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales. IByME-CONICET; Facultad de Medicina-UBA

La hemo oxigenasa (HO) es la enzima reguladora de la degradación fisiológica del hemo produciendo biliverdina, hierro y monóxido de carbono. Se han identificado tres isoformas de la misma: HO-2 y HO-3 constitutivas; y HO-1, inducible por metales, stress y procesos inflamatorios. La presencia de las isoformas HO-1 y HO-2 ha sido descrita en hígado y testículo de rata. Objetivo: Estudiar la expresión de las isoformas HO-1 y HO-2 en células de Leydig (CL) de ratas adultas y en la línea tumoral MA-10. Resultados: Por western-blot se detectó la expresión de las dos isoformas en ambos tipos celulares. Los niveles de HO-1 se incrementaron en CL de ratas tratadas con LPS. La actividad enzimática se determinó midiendo los niveles de bilirrubina y también se observó un aumento de la misma en CL de ratas tratadas con la droga (CL: 0.057 ± 0.001 ; CL+LPS: 0.215 ± 0.003 ; MA-10: 0.367 ± 0.023 μg bilirrubina/mg prot.h). Para estudiar los posibles efectos de HO sobre la esteroidogénesis, se midieron los niveles de testosterona (T) en CL y progesterona (P) en MA-10 en presencia del inhibidor de ambas isoformas; SnPPIX (50 μM). Tanto los niveles basales de esteroides, como los estimulados con una dosis submáxima de hCG, aumentaron significativamente con respecto al control. En CL (veces respecto control): SnPPIX: 1.5; hCG: 6.3; hCG + SnPPIX: 9.1; en MA-10: SnPPIX: 6; hCG: 25; hCG + SnPPIX: 50 ($p < 0.01$). Conclusiones: Los resultados muestran la expresión de HO-1 y HO-2 en CL y MA-10, observándose un aumento tanto de los niveles de HO-1 como de la actividad enzimática en CL de ratas tratadas con LPS. Además se sugiere que en ambos tipos celulares existe una actividad basal de la enzima que regula negativamente la esteroidogénesis (Subsidios: CIC, ANPCYT, CONICET, Beca Carrillo-Oñativia)

497. (3675) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD Y EXPRESION DE LA HEMO-OXIGENASA EN EL UTERO DE RATA. CELLA, MAXIMILIANO; SACCA, GERALDINE; FARINA, MARIANA; ROSENSTEIN, RUTH; FRANCHI, ANA MARÍA

CEFYBO-CONICET NROE, Departamento de Bioquímica Humana, Fac de Med, UBA

El útero es mantenido en quiescencia durante la preñez a pesar del crecimiento fetal. Se ha demostrado que durante la gestación aumentan los niveles de GMPc uterinos por un mecanismo independiente de óxido nítrico (NO). El monóxido de carbono (CO) es un relajante vascular y como el NO activa una guanilato ciclasa y por ende aumenta el contenido de GMPc. El CO se sintetiza durante la conversión de hemo a Fe y biliverdina catalizada por las isoenzima microsomales hemo oxigenasas (HO). Al presente se han identificado dos isoenzimas principales de la HO, una inducible (HO-1) y una constitutiva (HO-2). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar el sistema de HO en el útero de rata. Para ello, se determinó la actividad de HO (espectrofotometría), los niveles de HO (western blot), los niveles de GMPc (RIA) y el efecto de la bilirrubina sobre la peroxidación lipídica (método de TBARS). Los resultados indican la presencia de ambas isoformas en úteros de rata en diestro u ovariectomizadas. Un inhibidor de la HO disminuyó la acumulación de GMPc (SnPPIX 25 mM, 45% de inhibición). La bilirrubina inhibió significativamente la peroxidación lipídica uterina (10 nM 20% de inhibición). Durante la preñez, la actividad de HO presentó valores máximos los días 5 y 20 de preñez (día 5: 4.6 ± 0.5 ; día 13: 2.9 ± 0.3 , día 20: 4.5 ± 0.4 ng/mg prot.h). Los niveles de HO-2 no variaron a lo largo de la gestación, en tanto que los de HO-1 aumentaron significativamente a partir del día 19. Estos resultados avalan la presencia de ambas isoformas de HO, cuya ac-

tividad está asociada al control de los niveles de GMPc y la peroxidación lipídica uterina. Asimismo, estos resultados indican un claro patrón gestacional tanto de la actividad como de los niveles de HO-1 en el útero de rata.

498. (3808) ACCIÓN DE LA LEPTINA EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS PLACENTARIAS. MAGARIÑOS, MARIA PAULA; VARONE, CECILIA LAURA; FONTANA, VANINA; CALVO, JUAN CARLOS

*Depto de Química Biológica Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires *Depto. Química Biológica, FCEN, UBA - Lab. Biología de la Reproducción- IByME*

La leptina es una hormona proteica de 16 KDa secretada principalmente por los adipocitos con la función de determinar el balance energético del organismo mediante la interacción con receptores del SNC. Su expresión y la de sus receptores se han evidenciado también en otros tejidos como placenta, sugiriendo que podría tener otras funciones en tejidos periféricos. En mujeres embarazadas el nivel de leptina en suero aumenta principalmente durante el 2° y 3° trimestre, y en sueros de pacientes con abortos espontáneos se dosaron menores niveles de leptina, comparados con controles. Se sugiere que la leptina podría tener efectos sobre el crecimiento, la angiogénesis y la inmunomodulación afectando funciones maternas y fetales por mecanismos autócrinos y parácrinos. El objetivo planteado para este trabajo es estudiar la participación de leptina en el mecanismo de proliferación celular placentaria. Se utilizó como modelo la línea celular trofoblástica JEG-3, caracterizando los niveles de leptina endógena y su receptor por Western blot. La proliferación celular se midió por conteo de células, incorporación de 3H-timidina y análisis de FACS. El tratamiento con leptina de células JEG-3 produjo un aumento en la proliferación celular dosis dependiente siendo el máximo de 2.9 veces a una concentración de 250 ng/ml a los 3 días de incubación. Por otro lado el tratamiento con un oligonucleótido antisentido (2 μM) para leptina produjo una reducción de 3.25 veces en la proliferación a los 3 días de incubación. Estos resultados se correlacionaron con un aumento de apoptosis medida por fragmentación del ADN. El agregado exógeno de leptina revirtió parcialmente este efecto. Los resultados presentados atribuirían a la leptina el rol de hormona placentaria con capacidad estimulante del crecimiento celular.

499. (3850) EL ÓXIDO NÍTRICO COMO POSIBLE MEDIADOR DEL EFECTO DUAL DE HISTAMINA (HA) SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS TESTICULAR. MONDILLO, CAROLINA; RECHE, CECILIA; PATRIGNANI, ZORAIDA; PIGNATARO, OMAR

Instituto de Biología y Medicina Experimental. IByME-CONICET. Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales. IByME-CONICET.

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que concentraciones nanomolares de HA estimulan la esteroidogénesis en células MA-10 y células de Leydig de rata, principalmente mediante la activación de H₂[R] y el aumento en los niveles de AMPc. Por otra parte, resultados no mostrados sugerían un efecto inhibitorio de HA 10(-5)M en ambos tipos celulares. Objetivo: Estudiar el mecanismo de acción de HA 10(-5)M sobre la esteroidogénesis en células MA-10 y Leydig de rata, evaluando la posible participación de NO como mediador de los efectos inhibitorios. Métodos: Se utilizaron agonistas específicos de receptores H₁[R] y H₂[R]: HTMT-dimaleate (HT) y Dimaprit (DIM), respectivamente. Progesterona (Pg) y testosterona se determinaron por RIA. La actividad de NOS se midió por la conversión de [3H]-L-Arginina a [3H]-L-Citrulina. Resultados: Células MA-10: HA 10(-5)M inhibió la síntesis de Pg (En ng Pg/ 10(6) cél: C: 3.2 ± 0.2 , HA: 2.1 ± 0.2 ; $p < 0.05$). Se observó además un aumento significativo de la actividad de NOS en presencia de HA (En pmol cit/mg prot x 30 min: C: 3.0 ± 0.9 ; HA: 7.3 ± 0.3 ; $p < 0.05$). Por otra parte, HT 10(-7)M inhibió la producción de Pg en condiciones basales

(En ng Pg/10(6)cél: C: 1,6±0,4; HT: 1,0±0,1; p<0,01) y en presencia de hCG 1 ng/ml (En veces/C: hCG: 8,0±0,5; HT+hCG: 5,2±0,6; p<0,05). Para DIM 10(-7)M, en cambio, se observó un efecto estimulador (En ng Pg/10(6)cél: C: 3,3±0,2; DIM: 6,3±0,9; p<0,001; En veces/C: hCG: 8,8±0,9; DIM+hCG: 41,5±11,0; p<0,01). Se obtuvieron resultados similares en células de Leydig de rata. Los datos sugieren que el mecanismo de acción de HA(-5)M en células de Leydig involucraría la activación de receptores H[1]R, siendo el aumento en la actividad de NOS al menos una de las vías involucradas en mediar los efectos inhibitorios observados. (Subsidios: ANPCYT, CONICET, CIC y Beca Carrillo-Oñativia).

ENDOCRINOLOGIA Y REPRODUCCION XIII

500. (3371) PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LOS MECANISMOS QUE MEDIAN LA LIBERACIÓN DE CORTICOSTERONA EN LA GLÁNDULA ADRENAL. MOHN, CLAUDIA ESTER; FERNANDEZ-SOLARI, JAVIER; SCORTICATI, CAMILA; DE LAURENTIIS, ANDREA; PRESTIFILIPPO, JUAN PABLO; MCCANN, SAMUEL M; RETTORI, VALERIA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos Pennington Biomedical Research Center, LUS, Baton Rouge, LA, USA

Es bien conocido que la ACTH estimula AMPc que interviene en la síntesis y liberación de corticosterona (B) por la glándula adrenal (GA). También se conoce que simultáneamente ACTH disminuye los niveles de GMPc, los cuales regulan la fosfodiesterasa 2 (PDE2) que degrada AMPc. El Oxido Nítrico (NO) estimula la guanilato ciclasa con consiguiente aumento de GMPc. Por lo cual nuestro objetivo fue estudiar el efecto de ACTH sobre la actividad de la NOS (método Arginina C14), el contenido de GMPc y AMPc y liberación de PGE[2] y B (RIA) en presencia de los inhibidores de NOS (L-NAME) y COX (Indometacina) y un dador de NO (Nitroprusiato de Sodio). Se utilizaron las GA de ratas macho Wistar (n=8/grupo) incubadas in vitro. Los datos se analizaron con Student t test y ANOVA y test de Newman-Keul's, *p<0.5; **p<0.01; ***p<0.001. ACTH 10(-8)M disminuyó la actividad de la NOS (C:2.98±0.4; ACTH: 1.66±0.3 pmol NO/min/mg prot*) y GMPc (C:2.0 ±0.3; ACTH :1.1 ±0.2* pmol/mg prot). Aumentó AMPc (C:0.64±0.06; ACTH:1.37±0.3 pmol/mg prot*) y B (C:30.2±2; ACTH:52.9±7 ng/mg prot**). L-NAME 10(-3)M bloqueó el efecto de ACTH sobre la liberación de B (ACTH:52.9±7; ACTH+L-NAME:27.1±2 ng/mg prot***) sin modificar el aumento de AMPc inducido por ACTH. Nitroprusiato de Sodio (NP 600uM) aumentó la liberación de B (C:17.3±1.4; NP:34.8±3.5ng/mg prot***) y PGE[2](C:395.6±31.9; NP:614.6±58.2pg/mg prot**) y el contenido de AMPc (C:107.5±12.8; NP252.7±57 fmol/mg prot*) y GMPc (C:4.9±0.3, NP:6.98±0.5 pmol/mg prot*). Indometacina 10 (-3)M bloqueó el estímulo de NP sobre B (NP:34.78±3.5; Indo+NP14.7±1.4****) y AMPc (Indo+NP:157.7±26 fmol/mg prot*) Estos resultados sugieren que además del mecanismo clásico de liberación de corticosterona inducido por ACTH por la glándula adrenal, vía AMPc, existiría otro mecanismo en el cual participaría óxido nítrico y las prostaglandinas.

501. (3389) EFECTO DE DISTINTOS TIPOS DE RESTRICCIÓN ALIMENTARIA SOBRE EL PROCESO DE OVULACIÓN DE LA RATA. ROMAN, ERNESTO; RICCI, ANALÍA; SCORTICATI, CAMILA; FALETTI, ALICIA

Dto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA Dto Qca Biológica, FCEyN, UBA; Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET

La reproducción necesita de una adecuada nutrición y reserva energética. La leptina representa una señal crítica para las

adaptaciones neuroendócrinas al ayuno o a las malas condiciones nutricionales. Se demostró que la administración diaria de leptina adelanta la pubertad y restablece la función sexual en condiciones metabólicas adversas. En este trabajo estudiamos el efecto de bajos niveles de leptina producidos por distintos modelos de restricción alimentaria (aguda y crónica) sobre el proceso ovulatorio. Ratas inmaduras (26-28 días) tratadas con eCG/hCG para inducir su primera ovulación, fueron sometidas a un ayuno por 48 h (A), restricción alimentaria del 50% (R50) y del 70% (R70). La tasa ovulatoria, determinada por el número de ovocitos presentes en oviductos, y comparadas con animales con dieta normal fue: mayor en animales con ayuno (C:33±3, A:46±4, p<0.01), similar en animales sometidos a una R50 y significativamente menor en animales sometidos a una R70 (4±2, p<0.01). Sin embargo el contenido ovárico de prostaglandina E (PGE) preovulatoria, determinada por RIA y expresada en pgPGE/mg tejido, estaba significativamente disminuida en todos los casos con restricción alimentaria (C:529±50, A:342±30, R50:145±26, R70:103±19). Los niveles de leptina en suero estaban disminuidos en todos los casos de restricción alimentaria a niveles no detectables por RIA (C:255±44 pg/ml). El peso corporal, ovárico y la progesterona sérica de todos los animales sometidos a las distintas dietas, disminuyeron significativamente con respecto a los controles (P4: C:37±2, R70:16±3, ng/ml suero p<0.01). La administración intraperitoneal de leptina (3 dosis 5µg c/u) revirtió el efecto causado por el ayuno sobre la ovulación, pero dosis diarias de esta proteína (10µg) no revirtieron los efectos producidos por la restricción alimentaria severa. Estos resultados indican que una severa mala nutrición inhibe la ovulación en la rata y que altas dosis de leptina no fueron capaces de bloquear este efecto en nuestro modelo biológico.

502. (3440) EXPRESION DEL RECEPTOR 1 DE GALANINA (GAL1R) DE RATA EN TRIATOMA INFESTANS Y SU PROBABLE ROL COMO REGULADOR DEL EQUILIBRIO HIDRICO Y MINERAL EN INSECTOS. SANTINI, MARIA SOLEDAD; GUIMAREY, PILAR; MUSCIO, OSCAR; RONDEROS, JORGE

Cat Histol y Embriol Animal CEPAVE (UNLP-CONICET)

Los insectos representan un grupo de gran importancia sanitaria y el conocimiento de los mecanismos fisiológicos básicos resulta fundamental para el desarrollo de nuevos métodos de control. Debido a sus hábitos hematófagos, T.infestans (vector de la enfermedad de Chagas en nuestro país) sufre cambios osmóticos drásticos luego de cada alimentación, que implican la rápida eliminación del exceso de agua y sales minerales adquiridos con la dieta. Se ha demostrado que, en determinadas condiciones, el receptor 1 de Galanina se sobreexpresa en células epiteliales de intestino de rata induciendo un aumento en el flujo de agua y sales minerales. En el presente trabajo analizamos la expresión de proteínas inmunorreactivas para un anticuerpo desarrollado contra Gal1R de rata en distintos tejidos de T.infestans y su probable participación en los mecanismos que regulan el equilibrio hídrico y mineral en insectos. Los resultados muestran la presencia de inmunoreactividad en Tubos de Malpighi (análogos a la nefrona de mamíferos) siendo negativos en los otros tejidos analizados. Los controles realizados con el anticuerpo preadsorbido con el péptido de referencia demuestran que la marcación no se debe a reacciones inespecíficas. Mediante ELISA, se evaluó la variación de la expresión de Gal1R durante las primeras horas postalimentación en diferentes porciones del tubo digestivo. Se diseccionaron grupos de 3 insectos en diferentes momentos respecto de la alimentación (sin alimentar; 30 min y 24 hs luego de la alimentación). Los resultados se expresan como el porcentaje de variación respecto del grupo control (animales sin alimentar) observándose un aumento promedio (n=3) de un 374.13±178.46% a los 30 min. Los otros tejidos analizados no mostraron variación. Los resultados obtenidos sugieren que Gal1R o proteínas homólogas como el receptor de Allatostatina, podrían estar involucrados en el control del equilibrio hídrico y mineral en vinchucas.

503. (3444) EXPRESION DE ALLATOTROPINA EN TUBOS DE MALPIGHI DE VINCHUCAS Y LARVAS DE MOSQUITOS.
SANTINI, MARIA SOLEDAD; RONDEROS, JORGE

Cat Histol y Embriol Animal CEPAVEL (UNLP-CONICET)

Los insectos representan un grupo de importancia sanitaria debido a la capacidad de transmitir enfermedades que atacan al hombre. Entre estos, algunas especies de mosquitos y de vinchucas resultan de especial interés en nuestro país. Más allá de las evidentes diferencias entre estos organismos y los vertebrados, a nivel de los mecanismos de regulación básicos, los insectos y los mamíferos presentan numerosas homologías. Las larvas de mosquitos, debido a que crecen en ambientes acuáticos limitados (charcos, pequeños recipientes), están sujetas a cambios drásticos de osmolaridad que requieren una rápida respuesta de los sistemas de excreción. Por distintas razones, las vinchucas debido a su comportamiento hematófago, incorporan con cada alimentación un exceso de agua y sales minerales que debe ser rápidamente eliminado para dar comienzo a los procesos reproductivos y de crecimiento. La allatotropina, un neuropéptido involucrado en la regulación de la síntesis de Hormonas Juveniles, ha sido estudiada en diversos grupos de insectos pero hasta la fecha no se ha analizado su presencia en insectos triatomínos. En el presente trabajo se comunica la presencia de material inmunorreactivo para allatotropina en TM e intestino medio de vinchucas, así como en TM y otros tejidos relacionados con el equilibrio hídrico y mineral de larvas de mosquitos. Si bien las allatotropinas se consideran neuropéptidos, se ha señalado la presencia de mRNA de allatotropina en TM de otras especies. Además el tratamiento con dicha hormona estimula de manera específica la actividad de enzimas asociadas con la actividad de la bomba de Na⁺/K⁺ en los mismos tejidos. La producción por células de los TM de esta hormona, sugiere una función paracrina y/o autocrina a nivel de los órganos de excreción.

504. (3479) EFECTO DE LA HORMONA ALFA-MELANOCITO ESTIMULANTE Y DE UN ANTAGONISTA DE LOS RECEPTORES DE MELANOCORTINAS MC4 SOBRE LA EXPRESION HIPOTALÁMICA DE NOS Y COX. CARUSO, CARLA; MOHN, CLAUDIA²; KARARA, ARMANDO³; JAITA, GABRIELA; RETTORI, VALERIA²; SEILICOVICH, ADRIANA; LASAGA, MERCEDES

¹Facultad de Medicina ²CEFYO, CONICET, ³INST ROFFO, UBA

La hormona alfa-MSH presenta acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Investigamos el efecto de la alfa-MSH y HS024, un antagonista de los receptores de melanocortinas MC4, sobre la expresión de la oxido nítrico sintasa (NOS) y de la ciclooxigenasa (COX) en el hipotálamo de ratas machos. Los animales fueron inyectados i.c.v. con alfa-MSH (3 nmoles/rata) o HS024 (1 nmol/rata) y 30 min después con LPS (i.p., 250 ug/rata). Luego de 3 horas los animales fueron sacrificados y se les extrajeron fragmentos hipotálamicos. Se determinó la expresión de las isoformas inducible y neuronal de la NOS (iNOS y nNOS) y constitutiva e inducible de la COX (COX-1 y COX-2) por RT-PCR. La alfa-MSH revirtió en un 65% (p<0.05) el aumento en la expresión de iNOS inducido por LPS, sin presentar un efecto per se. El aumento en la expresión de iNOS inducido por LPS se vio incrementado por la presencia de HS024 (p<0.05). La alfa-MSH y HS024 no modificaron la expresión de nNOS. Por otro lado, ni la alfa-MSH, ni HS024 modificaron la expresión de COX-2 basal o inducida por LPS. No observamos modificaciones en la expresión de COX-1. Además, se determinaron los niveles séricos de PRL, LH y corticosterona. El LPS disminuyó significativamente la concentración sérica de PRL (p<0.01), mientras que la alfa-MSH no tuvo efecto per se, ni modificó el efecto inhibitorio del LPS. El LPS aumentó los niveles de corticosterona (p<0.001) y la alfa-MSH no tuvo efecto per se, pero disminuyó los niveles inducidos por LPS (p<0.001). La alfa-MSH modula la respuesta inflamatoria a la endotoxemia en el hipotálamo, disminuyendo la producción de NO, probablemente, a través de los receptores

MC4. El efecto de alfa-MSH parece ser selectivo dado que no fue capaz de modificar la expresión de COX-2 inducida por LPS. Además, la alfa-MSH disminuye la respuesta del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal a la endotoxemia.

505. (3614) CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES ESTRUCTURALES DE PROLACTINA HIPOFISARIA EN HÁMSTERES. CARINO, MONICA; CAMPO, STELLA; CREUSS, SILVINA; CONSOLE, GLORIA; CALANDRA, RICARDO; GONZALEZ CALVAR, SILVIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Fac. Medicina, UBA Fac.Medicina,UNLP;Hospital R.Gutierrez, CEDIE;IBYME;Fac.Cs.Exactas, UNLP;Fac.Medicina, UBA

La prolactina (PRL) es una hormona hipofisaria que ejerce diversos efectos biológicos. Se ha asociado esta versatilidad funcional con la microheterogeneidad molecular de dicha hormona. El objetivo de este trabajo ha sido establecer el perfil de isoformas moleculares de prolactina en hipófisis de hámsteres Dorados en distintas etapas del desarrollo mantenidos en condiciones lumínicas normales (FN, 10 hs luz-14 hs oscuridad) y en animales sometidos a fotoinhibición durante 14 semanas (FI, 6 hs luz-18 hs oscuridad). Los niveles de PRL hipofisaria, determinados por RIA (ug/hip, x±EMS) fueron: 15d=0,2±0,01; 25d=1,15±0,02; 35d=1,16±0,01; 50d=1,28±0,01; 60d=1,68±0,02 FI= 0,14±0,02. El fraccionamiento de homogenatos hipofisarios de los distintos grupos de animales en cromatografía de Sephadex G-100 indica la presencia de las siguientes fracciones: a) 11,15% tiene peso molecular (PM) superior a 130K, b) 10,65 % presenta un PM comprendido entre 40-60 K y c) 68% corresponde a PM menores (12-34K). Por otro lado, la cromatografía en columnas de Concanavalina A de homogenatos de hipófisis provenientes de hámsteres adultos en FN revela que sólo el 4,8% del contenido hipofisario de PRL es retenido por esta lectina. La electroforesis en gradiente de pH (3-10, Rotofor) muestra que el 69,8% de la hormona presenta un pI comprendido entre 4,43 y 5,53. Estos resultados muestran que, en hámsteres Dorados, los niveles de PRL hipofisaria varían en función de la edad y el fotoperíodo, a diferencia de otras hormonas hipofisarias. Las características fisicoquímicas de esta molécula indican que se trata de una proteína predominantemente ácida y que la principal isoforma detectada corresponde al PM descripto para el monómero.

506. (3860) TRANSPORTE DE SODIO EN SINCICIOTROFOBLASTO DE PLACENTA HUMANA. DEL MONACO, SILVANA; DAMIANO, ALICIA; ZOTTA, ELSA; IBARRA, CRISTINA; KOTSIAS, BASILIO

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari Lab. de Fisiopatología, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA

El sinciciotroblasto (SCT) es la capa de células más externa que recubre las vellosidades coriónicas. Este epitelio de características sinciciales es la barrera fisiológica entre la madre y el feto, regulando el pasaje transcelular de solutos y agua. El objetivo de nuestro trabajo es estudiar las proteínas relacionadas con el transporte de sodio en placenta humana ya que alteraciones en la expresión de esas proteínas pueden estar relacionadas con la patología de hipertensión arterial inducida por el embarazo, (preeclampsia), que suele originar retardo en el crecimiento fetal. Para ello se purificó ARN total de SCT y mediante la técnica de RT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos (primers), se amplificaron secuencias que codifican para las tres subunidades (alpha, beta y gamma) del canal epitelial de sodio (ENaC) y para APXL, una proteína apical relacionada con el transporte epitelial de sodio. Los productos de amplificación fueron clonados y secuenciados. Luego se realizó un Western Blot con un anticuerpo policlonal anti-APX que reveló una importante banda de ~160 kDa, similar a la proteína APXL de retina humana. Por inmunohistoquímica se detectó APXL en membrana citoplasmática del SCT. Dado que la información existente sobre el transporte de iones en placenta humana es escasa, nues-

tros resultados sobre la presencia de ENaC y APXL en SCT contribuirán a dilucidar los mecanismos involucrados en el movimiento de sodio y su regulación. Nosotros hemos comprobado que los ovocitos de Bufo arenarum carecen de corrientes de sodio sensibles al amiloride y representan un modelo apropiado para la expresión de las proteínas estudiadas.

507. (3945) EL HEXACLOROBENCENO DESREGULA EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRÓN. ALVAREZ, LAURA; HERNANDEZ, SUSANA; KOLLIKER-FRERS, RODOLFO; RANDI, ANDREA; KLEIMAN, DIANA L

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

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante del medio ambiente. Se acumula en el tejido adiposo blanco (TAB) y marrón (TAM). Su administración crónica a animales de laboratorio induce enzimas microsomales hepáticas, disfunciones endocrinas, porfirias y cancer. Las principales funciones del TAM son la termogénesis y el balance energético. La actividad de sus enzimas lipogénicas están bajo un complejo control hormonal y nervioso. El HCB produce hipotiroxinemia sin alterar los niveles de T3. Examinamos el efecto de la administración de HCB (1000 mg/Kg p.c.) durante 30 días por vía gástrica, a ratas Wistar machos, sobre el balance energético. Evaluamos: En TAM: a) Captación de 3H-2-deoxiglucosa, b) Niveles de transportador de glucosa Glut-4, por inmunoblot, c) Actividad de la lipoprotein-lipasa (LPL), d) Niveles de noradrenalina, e) Concentración de hormonas tiroideas, por RIA, g) Area lipídica en cortes histológicos. En suero: a) Niveles de triglicéridos, b) Niveles de insulina y glucosa. Resultados: a) la captación de 3H-2DOG aumenta 107%, $p < 0,002$, en el TAM, (C:422,5±61,1 dpm/mg prot), no presentando modificaciones en el TAB, b) los niveles de Glut-4 aumentaron 2,3%, $p < 0,02$, (C:16,6±0,9 UA), c) la actividad de la LPL aumentó 62 %, $p < 0,001$, (C:3,5±0,7 pmoles/mg prot), d) los triglicéridos disminuyeron 48,9%, $p < 0,02$, (C: 60,7±9,6 ug/dl), e) la noradrenalina no se modificó, f) la concentración de T4 no se modificó, sin embargo la de T3 disminuyó 19%, $p < 0,05$, (C:928,3 ± 49,9 pg/g), g) el HCB produjo un aumento en el área lipídica de 135,9 %, $p < 0,0001$, (C: 18,9±3,7), h) los niveles de insulina y de glucosa no se modificaron. Conclusión: El HCB induce un aumento en la captación de glucosa y de ácidos grasos, produciendo un acúmulo de lípidos y una hipertrofia celular en el TAM.

508. (3948) ESPECTRO DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA ENZIMA 21 HIDROXILASA (CYP21) EN POBLACION ARGENTINA: IDENTIFICACION DE CUATRO NUEVAS MUTACIONES SIN SENTIDO. MARINO, ROXANA; PEPE, C; BERGADÁ, I; ESCOBAR, M; GRYNGARTEN, M; HEINRICH, J; CIACCIO, M; RIVAROLA, MA; BELGOROSKY, A

Hospital de Pediatría JP Garrahan División de Endocrinología, Hospital de Niños "R. Gutierrez"

En un estudio previo se analizaron en 42 pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) formas clásicas (FC) por déficit de la 21 hidroxilasa las 7 mutaciones más frecuentes descritas. El objetivo de este estudio fue caracterizar en una población mayor con HSC FC y no clásica (FNC) las 10 mutaciones más frecuentes y secuenciar la región codificante del gen CYP21 en todos los alelos no detectados de las FC. Se analizaron 147 individuos (96 FC y 51 FNC) y se secuenció el gen en 13 pacientes (7.5%). Se hallaron 4 nuevas mutaciones sin sentido en 6 de ellos: R444X (exón 10), Y376X (exón 9), W19X y Q41X (exón 1). Estos pacientes con la forma clínica perdedora de sal, presentaron estas mutaciones que generan un codón STOP temprano, el cual sería responsable de la síntesis de una proteína truncada y del fenotipo observado. En un paciente con la forma clínica virilizante simple (VS) se halló un cambio A por T en el codón 64 (His por Leu en el exón 1). Este residuo se halla en una región no conservada por lo que probablemente se trataría de un polimorfismo. En 4 pacientes con la forma clínica VS se ha-

llaron 3 mutaciones descritas poco frecuentes: R426H, G424S y R408C. Los genotipos de estos pacientes fueron G424S/172N, R408C/172N y R426H/Q318X en dos de ellos. Estos genotipos correlacionan con los fenotipos descriptos para estas mutaciones. En 2 pacientes (ND/In2-Q318X, ND/Q318X) no se halló ninguna mutación en toda la región codificante. Concluimos que la secuenciación del gen CYP21 es necesaria para la caracterización completa del genotipo, cuando las mutaciones más frecuentes no están presentes. En los pacientes con la FC y con un solo alelo detectado, la causa del fenotipo podría deberse a cambios en las secuencias intrónicas, promotoras o a mutaciones exónicas silenciosas que podrían alterar secuencias reguladoras del splicing.

509. (3973) EXPRESIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE CD69 EN LIFOCITOS T: NUEVA SUBPOBLACIÓN REGULADORA? RAMHORST, ROSANNA ELIZABETH; CORIGLIANO, ADRIANA; FAINBOIM, LEONARDO

Lab. de Inmunogenética. Htal de clínicas, José de San Martín Laboratorio de Inmunogenética, Htal de Clinicas José de San Martín, facultad de Medicina, UBA

El endometrio uterino normal presenta una subpoblación de linfocitos T que expresa la molécula CD69 en su citoplasma. Esta subpoblación está significativamente aumentada en la sangre periférica y el endometrio de mujeres con abortos recurrentes espontáneos (ARE). Con el objetivo de una caracterización funcional de estas células, a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con ARE se "sortearon" por citometría de flujo las subpoblaciones CD3+CD69+ y CD3+CD69-. Las mismas se desafiaron con PHA, IL-2 o células alógenicas. Luego de 72hs se evaluó la respuesta proliferativa y la secreción de IFN gama y de IL-10 en los sobrenadantes (esta última por la técnica de ELISA). Frente a todos los estímulos analizados, la población CD3+CD69+ presentó una respuesta proliferativa y una secreción de citoquinas significativamente menor, pero manteniendo los mismos niveles de secreción de IL-10 en respuesta al estímulo alógeno, en comparación con la población CD3+CD69-. Cuando se estudió la cinética de expresión de CD69 intracitoplasmática y de membrana en linfocitos T aloreactivos durante la respuesta alógena se observó una disminución de la expresión intracitoplasmática y un aumento de la expresión en membrana en forma dependiente del tiempo. Finalmente, cuando a los alocultivos se les adicionó un suero obtenido de mujeres fértiles (que suprime la respuesta alógena), se observó un aumento en la expresión intracelular de CD69. Este efecto no se observó con el suero de pacientes con ARE (que estimulan la respuesta alógena). El conjunto de estos resultados sugieren que la población CD3+CD69+ intracitoplasmática estaría involucrada en la modulación de la respuesta alógena a través de un mecanismo que podría involucrar entre otros a la IL-10.

FARMACOLOGÍA II

510. (3450) UNA DIETA SUPLEMENTADA CON ANTIOXIDANTES TIÓLICOS, INGERIDA DURANTE 5 SEMANAS, MEJORA LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE RATONES CON ENVEJECIMIENTO PREMATURO. DE LA FUENTE, MÓNICA; ALVAREZ, PEDRO; ALVARADO, CARMEN; PUERTO, MARTA; GUAYERBAS, NOELIA

Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid

En el envejecimiento se produce un deterioro de las funciones inmunitarias, lo cual se encuentra asociado a una progresiva oxidación. En el presente trabajo se han estudiado los efectos de la ingestión de una dieta suplementada con dos antioxidantes tiólicos, la n-acetilcisteína (NAC) y la tioprolina (TP) sobre diversas funciones de leucocitos de ratones con envejecimiento prematuro (PAM). Se han utilizado ratones Swiss de 2

meses de edad, los cuales fueron clasificados en PAM y NPAM (no prematuramente envejecidos) en base a la realización de una prueba exploratoria en un laberinto en T. PAM y NPAM recibieron una dieta suplementada con NAC+TP (0,1% p/p de cada) durante 5 semanas, o bien una dieta estandar (A04) los controles. Tras este tiempo se obtuvo la suspensión peritoneal (en la que se encuentran: macrófagos, linfocitos y células NK), estudiándose las siguientes funciones: adherencia, movilidad, fagocitosis, capacidad digestiva, linfoproliferación, liberación de interleuquina 2 y actividad NK. Los PAM muestran peores funciones inmunitarias que los NPAM, pero la ingestión de los antioxidantes mejora dichas funciones. Así, la actividad NK (% lisis tumoral) fue: 48 ± 6 y 21 ± 5 en NPAM y PAM controles ($p < 0,001$), y 52 ± 10 y 54 ± 11 en NPAM y PAM tratados, respectivamente, lo que demuestra una acción estimuladora de la ingestión de los antioxidantes en los PAM ($p < 0,001$). Dado que la funcionalidad impunitaria es un marcador de salud y longevidad, la suplementación con antioxidantes estudiada podría ser útil para mantener la salud y consecuentemente, conseguir una mejor longevidad. Este trabajo ha sido financiado por el MCYT (BFI 2001-1218), CM (08.5/0061/2001) y Danone-UCM (PR248/02-11693).

511. (3462) LOSARTAN DISMINUYE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HÍGADO Y RIÑÓN DE RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS. POLIZIO, ARIEL HECTOR; PEÑA, CLARA

Departamento de Química Biológica, IQUIFIB-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

En las ratas espontáneamente hipertensas la producción de especies reactivas del oxígeno está aumentada, con el consecuente daño oxidativo a tejidos. El objetivo del trabajo fue investigar si la administración de losartan en el agua de bebida (10 mg/kg/día) durante 14 días (SHR-Lo) reduce el estrés oxidativo en dichos animales, en comparación con el determinado en ratas sin tratamiento (SHR). Se evaluó el daño oxidativo en homogeneizados de riñón e hígado aislados de ratas SHR y SHR-Lo, midiendo los siguientes parámetros: peroxidación lipídica (TBARS), los niveles de glutatión reducido (GSH) y las actividades enzimáticas de las clásicas enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (Gpx). Los niveles de TBARS disminuyeron 45% en hígado de SHR-Lo, respecto a SHR ($p < 0.05$), mientras que no hubo cambios significativos en riñón. El GSH aumentó 37% en riñón ($p < 0.05$) y 28% en hígado ($p < 0.05$) de SHR-Lo. Respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes se produjo un aumento del 90% y 32% ($p < 0.0001$) de Gpx en riñón e hígado, respectivamente y la actividad de la SOD aumentó 98% en riñón ($p < 0.05$) y 110% ($p < 0.0001$) en hígado de SHR-Lo. La actividad de la CAT disminuyó 18% ($p < 0.05$) en hígado de SHR-Lo, mientras que no se modificó en el riñón. La disminución de TBARS, el aumento de GSH, SOD y GPx en ambos órganos indican que la administración de losartan disminuye el daño oxidativo en hígado y riñón de las SHR. Estos resultados sugieren que la Ang II cumple un papel importante en la producción del estrés oxidativo en los animales SHR y que el tratamiento con losartan revierte este efecto.

512. (3648) CUMARINAS DI Y TRI OXIGENADAS, NUEVOS AGENTES DIFERENCIANTES DE CELULAS LEUCEMICAS HUMANAS. RIVEIRO, EUGENIA; FERNANDEZ, NATALIA; MONCZOR, FEDERICO; DEBENEDETTI, SILVIA; DE KIMPE, NORBERT; BALDI, ALBERTO; SHAYO, CARINA; DAVIO, CARLOS

Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Cátedra de Farmacognosia, FCE, UNLP. Department of Organic Chemistry, University of Ghent, Belgium.

La utilización de agentes inductores de diferenciación resulta una opción promisoría para el tratamiento de leucemias. Basados en datos bibliográficos sobre actividad diferenciante y antiproliferativa de cumarinas, ensayamos el efecto de cuatro

cumarinas: 5-metoxi-metilendioxicumarina (C1), 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (C2), 6,7-metilendioxicumarina (ayapina) y 7-hidroxi-6-metoxicumarina (escopoletina), aisladas de *Pterocaulon polystachyum*, sobre la línea celular promonocítica humana U-937. La actividad diferenciante se evaluó por inducción de la capacidad de reducir NBT y por la expresión de CD88 (receptor a C5a), midiendo la variación de Ca²⁺ y la respuesta quimiotáctica frente al estímulo con C5a. Por otra parte, evaluamos inhibición de proliferación (C150) y citotoxicidad (DC50).

	Vehículo	Control positivo	C1 8,5 μ M	C2 4,4 μ M	Escopoletina 3,3 μ M	Ayapina 16,8 μ M
Aumento de Ca ²⁺	0	1	0.85	0.85	0.73	0.38
Quimiotaxis (%)	3.8 ± 0.2	$17.8 \pm 0.8^*$	$13.8 \pm 1.8^*$	$10.5 \pm 0.5^*$	ND	ND
Reducción de NBT (%)	3.1 ± 0.4	$19 \pm 1.4^*$	$11 \pm 0.3^*$	$9.4 \pm 0.4^*$	$8.8 \pm 0.3^*$	$6.3 \pm 0.2^*$

(*) $p < 0.05$ ND: No determinado

C1 y C2 produjeron inhibición de la proliferación y maduración de las células U-937. Ayapina y escopoletina indujeron diferenciación sin producir inhibición de la proliferación. La menor actividad diferenciante de estas dos cumarinas con respecto a C1 y C2 sugiere que la presencia de un sustituyente oxigenado en C-5 podría ser de importancia en la actividad diferenciante. Escopoletina mostró una mayor citotoxicidad (DC50: $51.5 \pm 1.0 \mu$ M) que C1, C2 y Ayapina (251.5 ± 1.1 , 265.8 ± 1.1 , $461.7 \pm 15.3 \mu$ M respectivamente), que podría deberse al reemplazo del grupo metilendioxi por un grupo OCH₃ y OH. Estos resultados señalan la importancia de la estructura de las cumarinas en la actividad diferenciante de las mismas.

513. (3728) ACCIÓN VASOCONSTRICCIÓN DE LOS ISOPROSTANOS VÍA RECEPTORES PARA TROMBOXANO (RECEPTORES TP) EN VENA UMBILICAL HUMANA (VUH). DARAY, FEDERICO MANUEL; MINVIELLE, ANA ITATÍ; PUPPO, SOLEDAD; ROTHLIN, RODOLFO PEDRO

Tercera Cátedra de Farmacología. Facultad de Medicina. UBA.

Introducción: Los isoprostanos son compuestos producidos no enzimáticamente a partir del ácido araquidónico a través de un mecanismo de peroxidación. Los mismos promueven diferentes actividades biológicas, entre ellas contracción de diversos lechos vasculares. Está en discusión si las acciones biológicas son mediadas por receptores específicos para isoprostanos o a través de receptores TP. En VUH hemos descrito recientemente la presencia de receptores TP. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si los isoprostanos, 8-iso-PGE[2] y 8-iso-PGF[2alfa], contraen la VUH y si este efecto está mediado por receptores TP. Materiales y Métodos: Se midió la tensión isométrica de anillos de VUH mantenidos en solución de Krebs, a 37°C, pH: 7.4 y burbujeados con carbógeno. Luego de 2h. de estabilización se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) a 8-iso-PGE[2] y 8-iso-PGF[2alfa] en ausencia o presencia (30 min. antes de las CCR) de los antagonistas selectivos de los receptores TP: ICI-192,605 (1-10nM) y SQ29548 (10-100nM). Resultados: 8-iso-PGE[2] produjo contracción concentración dependiente, con una pCE[50] de 6.9 ± 0.1 y una rta. max. de 14,7g (n=15). Para 8-iso-PGF[2alfa] la pCE[50] fue de 6.1 ± 0.1 y la rta. max de 12,2g (n=13). Los antagonistas empleados produjeron un bloqueo competitivo de las CCRs a ambos isoprostanos. Los valores de pA[2] estimados para el ICI y el SQ frente al 8-iso-PGE[2] fueron 8.8 ± 0.1 y 8.0 ± 0.1 , respectivamente. Además, similares valores fueron obtenidos para el ICI (9.1 ± 0.1) y SQ (8.2 ± 0.1) frente al 8-iso-PGF[2alfa]. Conclusión: Estos resultados indican que los isoprostanos producen contracción de la VUH con eficacia casi máxima y aparentemente, los receptores TP están involucrados

en esta acción en función de los valores de potencia obtenidos con los correspondientes antagonistas.

514. (4006) LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y EFECTO VASODILATADOR DEL NITROPRUSIATO DE SODIO (NPS) EN VENA UMBILICAL HUMANA (VUH). MÁRQUEZ RODAS, IVÁN; BALFAGÓN, GLORIA; NOWAK, WANDA; REY ARES, VERÓNICA; ERRASTI, ANDREA EMILSE; ROTHLIN, RODOLFO PEDRO

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, España. Tercera Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA.

Existen controversias acerca de la relevancia funcional de la liberación de NO del endotelio de la VUH en la perfusión fetal, tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas (preeclampsia, distress fetal, etc.). El objetivo fue evaluar la posible liberación espontánea de NO por el endotelio de la VUH así como la respuesta vasodilatadora a un dador de NO, el NPS, en este tejido. Para ello se emplearon anillos de VUH, obtenidos de partos normales que fueron montados en baños de órgano aislado en solución de Krebs a 37 °C, pH 7,4, burbujeados con 95% O₂ / 5% CO₂. Luego se realizaron curvas concentración-respuesta a NPS previa contracción submáxima con KCl 40 mM. Para la medición de NO, los anillos se incubaron durante 2hs en un aparato de Dubnoff en solución de Krebs a 37°C y burbujeado con carbógeno. La solución de Krebs fue reemplazada cada 15 min tomándose las muestras respectivas y los valores de nitritos (NO[2](-)) obtenidos corresponden a la sumatoria de las 2hs de incubación. La detección de NO[2](-) se realizó por la reacción colorimétrica de Griess y la detección histológica de endotelio aplicando la técnica de tinción con nitrato de plata. Los valores de NO[2](-) obtenidos de anillos con endotelio (0,047±0,012 nmoles/mg, n=7) fueron superiores a los obtenidos en anillos sin endotelio (0,013±0,024 nmoles/mg, n=7, p<0,05). La aplicación del inhibidor de la NO sintetasa, L-NAME, redujo los valores de NO[2](-): control, 0,032±0,005 nmoles/mg, n=5; tratado, 0,015±0,003 nmoles/mg, n=5, p<0,05. Por otro lado, la pCE[50] y la relajación máxima obtenida con NPS fue de 7,20±0,20 y 75±9%, respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que en la VUH el endotelio produce liberación espontánea de NO y que la administración de un dador exógeno de NO (NPS) promueve vasodilatación.

515. (4007) POTENCIACIÓN DEL EFECTO VASOCONTRACTOR DE BRADICININA (BK) POR INHIBICIÓN DE LAS ENZIMAS CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ECA) Y ENDOPEPTIDASA NEUTRA (EPN) EN ARTERIA UMBILICAL HUMANA (AUH). PELOROSSO, FACUNDO; BRODSKY, PAULA TAMARA; ZOLD, CAMILA LIDIA; HALPERIN, ANA; ROTHLIN, RODOLFO PEDRO

Tercera Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La BK es un potente vasoconstrictor en AUH. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el receptor involucrado en la respuesta a BK y evaluar la posible participación de ECA y EPN en la inactivación biológica de dicho agonista. Para ello, se emplearon anillos de AUH obtenidos de cordones de partos normales. Los anillos fueron montados en un baño de órgano aislado en solución de Krebs a 37°C, pH 7.4, burbujeados con 95% O₂/5% CO₂. Se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) a BK (agonista selectivo de los receptores B[2] a cininas) luego de 2 hs o 5 hs de incubación. Los inhibidores enzimáticos y el antagonista selectivo de los receptores B[2] a cininas, HOE-140, fueron agregados al baño 30 min antes de la ejecución de las CCRs. Los resultados están expresados como media ± SEM. Luego de 5 hs de incubación se efectuaron CCRs a BK y las pCE[50] fueron incrementadas por el pretratamiento con captopril 10(-6)M, fosforamidón 10(-5) M o con la exposición a ambos (control: 7.76 ± 0.32, n=17; captopril: 8.34 ± 0.08, P<0.001;

fosforamidón: 8.61 ± 0.11, P<0.001; captopril + fosforamidón: 8.52 ± 0.09, P<0.001, n=10). Finalmente, en anillos expuestos a ambos inhibidores, HOE-140 produjo un antagonismo competitivo de las respuestas a BK obtenidas a las 2 hs (pK[B] 8.73). Estos resultados sugieren que en AUH las enzimas ECA y EPN son efectivas para producir la inactivación biológica del agonista endógeno BK, posiblemente reduciendo su concentración en biofase.

516. (4008) CONSUMO DE DROGAS EN ADOLESCENTES DE CIUDADES CHICAS. FULLONE, CARLOS ENRIQUE; SALGADO, CARLOS MARIA

Hospital Durán. Centros de Educación Física de Carmen de Areco, San Andrés de Giles y Suipacha.

Introducción: El consumo de estupefacientes produce diversas enfermedades médicas, y sociológicas, siendo una causa común de morbimortalidad, fundamentalmente en los segmentos más jóvenes de la población. Este flagelo se lo cree circunscripto a los grandes centros urbanos. Objetivos: Evaluar la incidencia de drogadicción en jóvenes de ciudades chicas, y concientizar a la población y a sus autoridades sobre el tema. Material y Métodos: Se realizó encuesta anónima a 1690 alumnos del nivel medio de enseñanza de las tres localidades estudiadas, en forma simultánea para cada localidad, divididos por sexo y edad, habiéndose consultado sobre si recibieron ofrecimiento de drogas, donde se les ofreció, si habían consumido, que consumían, cuantas veces lo habían hecho, si conocían adictos, si conocían quien distribuía, y si, en caso de querer consumir, sabían donde obtenerla, dejando una última pregunta de libre expresión de los alumnos. Resultados: Confesaron consumo de drogas el 4,6% de los alumnos, y haber recibido el ofrecimiento de la misma el 10,1% de los mismos, habiéndose analizado también el lugar donde se efectuaba dicho ofrecimiento predominando la calle. El 34,7% al 42% de los alumnos sabe quién consume, quién vende o cómo conseguir droga. Discusión: Se configura un grupo de riesgo en varones de más de quince años que confesaron consumir drogas el 9,2% de los mismos. Los mensajes dejados libremente por los jóvenes llaman a una profunda reflexión. Conclusiones: Se demostró la existencia real del flagelo en pueblos donde se "conocen todos" y configurando UN SECRETO A VOCES los caminos de su difusión, generando la sospecha de complicidades con el tema. Concientizando a la población sobre la autovigilancia de los conocidos lugares de venta podría ayudar en forma eficaz al combate del narcotráfico.

517. (4063) CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS INVOLUCRADOS EN LA VASOCONSTRICCIÓN INDUCIDA POR ACETILCOLINA (ACH) EN VENA UMBILICAL HUMANA (VUH). PUJOL LEREIS, VIRGINIA A; HITA, FRANCISCO J; GOMEZ VERDI, MARCELA R; RODRIGUEZ, MARÍA C; GOBBI, MAURO D; ROTHLIN, RODOLFO P

Tercera Cátedra de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la función de las colinesterasas y los diferentes subtipos de receptores muscarínicos posiblemente involucrados en la respuesta contráctil a ACh en VUH. Utilizando la técnica de órgano aislado, anillos de VUH fueron incubados en solución de Krebs a 37°C, pH 7.4, burbujeados con carbógeno. Luego de 150 min de incubación se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) a ACh. Los datos se expresan como media ± SEM. Las exposiciones a neostigmina (inhibidor de acetilcolinesterasa, 10µM) y a tetraisoopropil-pirofosforamida (iso-OMPA, inhibidor de butirilcolinesterasa, 100µM) no modificaron las CCRs a ACh (pCE50 control: 6.04±0.09; neostigmina: 6.21±0.09, p>.05; pCE50 control: 6.28±0.04; iso-OMPA: 6.25±0.06; p>.05). Atropina, antagonista muscarínico no selectivo (1nM, 3nM, 10nM), desplazó competitivamente la CCR a ACh (pA₂: 9.75). Pirenzepina (antagonista selectivo de los receptores M1, 0.17µM) produjo un co-

rrimiento hacia la derecha de la CCR (pCE50 control: 5.96±0.07; pirenzepina: 4.99±0.07, p<.05; pA2 aparente: 7.58) sin afectar la respuesta máxima. El para-fluoro-hexahidro-sila-difenidol-hidroclorido (p-FHHSiD, antagonista selectivo de los receptores M3, 30nM) corrió hacia la derecha la CCR (pCE50 control: 6.14±0.06; p-FHHSiD: 5.66±0.08, p<.01; pA2 aparente: 7.94). Metocramina (antagonista selectivo de los receptores M2, 1µM) desplazó hacia la derecha la CCR a ACh (pCE50 control: 5.61±0.08; metocramina: 4.96±0.14, p<.001; pA2 aparente: 7.20) sin modificar la respuesta máxima. Estos resultados indican que en VUH las colinesterasas no modifican la concentración efectiva de ACh en biofase y, además, en función de la potencia de los antagonistas, sugieren que su acción puede involucrar la activación de receptores M3 y M1.

GASTROENTEROLOGIA III

- 518. (3567) EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON ALUMINIO (AL) SOBRE LA EXPRESIÓN Y LA ACTIVIDAD DEL TRANSPORTADOR CANALICULAR MULTIESPECÍFICO DE ANIONES ORGÁNICOS MRP2.** GONZALEZ, MARCELA AIDA; LUJÁN, ÁLVAREZ; MARCELO, ROMA; MARÍA CRISTINA, CARRILLO

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral 2 Instituto de Fisiología experimental. UNR Rosario

En trabajos previos se demostró que el aluminio (Al) produce una alteración en la excreción biliar de aniones orgánicos colefilicos observándose una disminución significativa en la constante intrínseca de transferencia canalicular hígado-bilis (r3) determinada por estudios farmacocinéticos de decaimiento plasmático del anión orgánico Bromosulfotaleína. Dado que el pasaje a bilis del anión orgánico se produce a nivel del transportador canalicular multiespecífico MRP2, el objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión y la actividad transportadora de MRP2 en ratas Wistar machos adultas. Los grupos experimentales (n=5 c/u) fueron: A: controles; B: tratadas con aluminio (Al elemental, 27 mg/Kg de peso i.p., 3 veces por semana durante 3 meses). Se midió la actividad transportadora de MRP2 a través de la determinación de la concentración y excreción biliar de DNP-SG (dinitrofenil-S-glutation) por espectrofotometría y los niveles de MRP2 en membranas plasmáticas totales por Western Blotting. Resultados: Al disminuyó significativamente la actividad transportadora del MRP2 (-40%, P<0,05) y su expresión en membrana plamática (-50%, P<0,05). Conclusión: la exposición crónica al Al ocasiona una disminución funcional en la capacidad excretora canalicular de aniones orgánicos colefilicos evidenciada por la inhibición parcial de la expresión y la actividad transportadora de MRP2.

- 519. (3652) EVOLUCIÓN FUNCIONAL TEMPORAL EN TÉRMINOS DE PRODUCCIÓN DE ALBÚMINA EN HEPATOCITOS PORCINOS Y HUMANOS IN VITRO.** MARIN, MARIA CELESTE; LORENTI, ALICIA; BARBICH, MARIANA; HIDALGO, ALEJANDRA; IELPI, MARCELO; CALLERO, MARIA FLORENCIA; ARGIBAY, PABLO

ICBME-Hospital Italiano Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental. Hospital Italiano de Buenos Aires.

El desarrollo de un hígado bioartificial (BAL), como sistema de soporte de pacientes en falla hepática fulminante, requiere de un gran número de hepatocitos funcionales, que mantengan sus características fisiológicas. Dentro de estas últimas, la síntesis de albúmina es un marcador específico de la función del hepatocito, en general no descrita en los BAL. El objetivo de este trabajo fue describir la cinética de la producción de albúmina de hepatocitos porcinos y humanos en diferentes modalidades de cultivo. La albúmina fue detectada por el método de Western blot tanto en los lisados celulares como en los medios

condicionados obtenidos a diferentes tiempos de cultivo. En los hepatocitos porcinos se observó albúmina intracelular solo en las células recién aisladas, mientras que en los hepatocitos humanos la detección se mantuvo a lo largo de todo el período de cultivo en placa (28 días). En los sobrenadantes de los cultivos de hepatocitos porcinos y humanos, se detectó durante 13 y 21 días respectivamente, disminuyendo en ambos casos la producción en forma progresiva. En el cultivo de esferoides porcinos solo se observó albúmina en los medios metabolizados durante 3 de los 4 días de cultivo total. Estos resultados muestran que los hepatocitos mantenidos in vitro mantienen una función característica por períodos prolongados de tiempo. Esta detección prolongada de albúmina en células como potenciales componentes biológicos de un BAL es una medida necesaria de la calidad de las mismas debido a que una de las limitaciones principales de los BAL descriptos es la ausencia de un método adecuado de validación funcional.

- 520. (3655) AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS OVALES EN HÍGADO FETAL Y NEONATO DE RATÓN.** TORRES, JOSÉ; LORENTI, ALICIA; BIANCHI DE DI RISIO, CATALINA; BARBICH, MARIANA; HIDALGO, ALEJANDRA; ARGIBAY, PABLO

ICBME-Hospital Italiano Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental. Hospital Italiano de Buenos Aires.

El hígado basa su capacidad regenerativa en la activación de hepatocitos maduros en daños leves y moderados, o en la activación de stem cells (células ovals), en los casos de injurias graves y/o reiteradas. Estas últimas pueden diferenciarse en hepatocitos y en células epiteliales biliares. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar las células ovals y hematopoyéticas presentes en condiciones fisiológicas en hígados fetales o neonatos de ratón. Los hígados de fetos desde 14,5 dpc hasta el nacimiento, y neonatos de hasta 7 días, se extrajeron y digirieron enzimáticamente. Las células se separaron mediante gradientes de Percoll (50% y 60%) o bien utilizando un método de separación comercial (Spin Sep). Las poblaciones obtenidas por ambos métodos fueron similares, y se caracterizaron tanto inmediatamente después del aislamiento como previamente cultivadas, por inmunohistoquímica, utilizando: un pool de anticuerpos anti stem cells hemopoyéticas, anticuerpos anti OC2 y OC3 para caracterizar la población de células ovals, y un marcador específico para los hepatocitos maduros ("Hepatocyte"). En una fracción se identificaron células hemopoyéticas y una población muy pequeña de células con características de células ovals (OC2 y OC3 +), y en otra fracción células hepáticas maduras. Las células ovals fueron identificadas tanto en las células recién aisladas, como cultivadas durante 15 días, manteniendo su indiferenciación durante el período de cultivo. Las células cultivadas con factores para estimular el desarrollo de poblaciones hemopoyéticas, no mostraron marcación de células ovals, pero sí de stem cells hemopoyéticas. Estos resultados muestran que se pueden obtener células indiferenciadas del hígado fetal o neonatal aún después del cultivo pese a que su número es bajo. Las características de las células ovals, su indiferenciación y su bipotencialidad, permitiría utilizarlas en aplicaciones de reemplazo tisular en enfermedades degenerativas del hígado.

- 521. (3680) PLEXO DE AUERBACH INTESTINAL EN RATA B (OBESA) SOMETIDA A DOS TIPOS DE REGÍMENES ALIMENTICIOS DE CORTA DURACIÓN.** HISANO, NORIYUKI; FELTRER, ANA LAURA

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR

Habiendo estudiado que la restricción dietaria prolongada protege al plexo de Auerbach de las modificaciones producidas con una dieta ad libitum, decidimos estudiar el efecto de una restricción dietaria corta en ratas jóvenes. Ratas machos de la línea "β", obesa, (hipertriglicéridémica) alimentadas ad libitum hasta los 60 días fueron divididos en: 1.- Alimentadas ad libitum (DAL) con die-

ta balanceada comercial 2.-Restricción dietaria (RD) que correspondió al 66% de DAL. A los 120 días de edad fueron sacrificadas con sobredosis de éter. En la autopsia se diseccionó el intestino delgado y colon, se lavó con PBS, se midieron y pesaron. Segmentos del intestino delgado, colon proximal y colon distal fueron procesados con la técnica histoquímica del NADH. El peso corporal en RD fue menor (317 ± 10.02 g) que en DAL (448 ± 5.81 g) ($P < 0.05$). Intestino delgado RD (3.12 ± 0.37 g/100), DAL (2.21 ± 0.27 g/100) ($P < 0.05$). Colon RD: (0.75 ± 0.07 g/100), DAL (0.54 ± 0.04 g/100) ($P < 0.05$). La longitud fue mayor en DAL: intestino delgado RD: 111.75 ± 2.17 cm), DAL (118.00 ± 2.77 cm) ($P < 0.05$). Colon RD (16.75 ± 0.25 cm), DAL (19.50 ± 0.75 cm) ($P < 0.05$). El intestino delgado, colon proximal y colon distal de los animales con RD mostraron zona de plexo conservado (aspecto reticular), alternado con zonas del plexo de Auerbach destruidas y aumento de vascularización. En cambio con DAL, los plexos de Auerbach mostraron una mayor destrucción, más severa en el intestino delgado. La dismetabolopatía de esta línea (sobrepeso) provocaría alteraciones en las células NADH positivas del intestino, desde edades tempranas, más evidentes en el intestino delgado. La restricción dietaria después de los 60 días de edad podría posponer pero no detener el deterioro posterior del plexo de Auerbach.

522. (3683) EFECTOS DE LA DIABETES INDUCIDA POR ALOXANO EN EL PLEXO DE AUERBACH INTESTINAL DE RATAS POSTDESTETE. RODRÍGUEZ, GUILLERMO; HISANO, NORIYUKI

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR

La diabetes puede acompañarse con disfunción intestinal. A partir de un modelo experimental de ratas diabéticas inducidas por inyección de aloxano en el posdestete estudiamos sus efectos sobre el plexo de Auerbach intestinal. Ratas machos de 22 ± 3 días de edad de la línea "m" se inyectaron con aloxano (24 mg/100g peso corporal), a otro grupo considerado como controles se las inyectó con agua destilada (10 cc/100g peso corporal). En los animales inyectados con aloxano se determinaron la glicemia para asegurarnos de su estado diabético. Se sacrificaron cada quince días a partir de los 7 días hasta los 54 días postinyección. por sobredosis de éter. Se diseccionaron los intestinos delgados y colon, fueron lavados con PBS, luego medidos y pesados. Segmentos de intestino delgado, colon proximal y colon distal se prepararon para la técnica histoquímica del NADH. Se constató un menor aumento de la biomasa en los animales diabéticos. Clínicamente, las ratas inyectadas con aloxano presentaron diarrea. El peso y longitud intestinal y colónico diabéticos se aproximaron al de los controles. Las alteraciones del plexo de Auerbach (desaparición de la imagen reticular) se observó a edades tempranas desde los 7 días postinyección. Las alteraciones fueron más acentuadas en el intestino delgado que en el colon. Estos hallazgos permiten comprender la diarrea y la disfuncionalidad intestinal que las ratas diabéticas sufren, evidenciando una mayor sensibilidad del intestino delgado a la diabetes, en concordancia con otros estudios realizados por otras técnicas. No se descarta la participación de un efecto tóxico del aloxano en las modificaciones a edades tempranas en nuestro modelo experimental. La diferencia de la reactividad de los distintos segmentos intestinales podría deberse a un sistema complejo de inervación y denervación autonómica del intestino.

523. (3757) ACTIVIDAD DE P-GLICOPROTEÍNA HEPÁTICA EN UN MODELO DE INTOXICACIÓN AGUDA POR PARACETAMOL EN RATAS. GHANEM, CAROLINA; GÓMEZ, PAULA C; ARANA, CECILIA; PERASSOLO, MARÍA; OCHOA, ELENA; MOTTINO, ALDO

Cátedra de Fisiopatología. FFyB.UBA Instituto de Fisiología experimental (IFISE). UNR

Introducción: Previamente mostramos una disminución de la expresión de P-gp en homogenato de hígado en la intoxicación

aguda por APAP. Objetivo: Evaluar la actividad de este transportador a través de la excreción biliar de digoxina (D), un sustrato modelo de P-gp, en hígado aislado y perfundido (HAP) e in vivo. Materiales y Métodos: P: inyección con APAP (1g/kg peso, i.p., n=4), C: inyección con vehículo (n=4). HAP: se utilizó un sistema recirculante con 1 μ M de D en el reservorio. Se recolectó muestra de bilis y perfusado durante 45 min. Modelo in vivo: Se inyectaron 0.02 mg/kg de peso de D en la vena yugular y se recolectó bilis y sangre durante 120 min. El flujo biliar se determinó por gravimetría y la concentración de D utilizando D tritiada como trazador. Resultados: HAP: El grupo P presentó una disminución en la excreción biliar de D entre los 15 y 45 min de perfusión. T15 (tiempo 15 min): $P=2.83 \pm 1.71$ vs $C=8.10 \pm 3.34^*$; T20: $P=2.71 \pm 1.47$ vs $C=6.74 \pm 2.14^*$; T25: $P=2.59 \pm 1.57$ vs $C=5.80 \pm 1.64^*$; T30: $P=2.23 \pm 1.28$ vs $C=5.62 \pm 1.20^{**}$; T35: $P=1.74 \pm 1.00$ vs $C=5.32 \pm 1.87^*$; T40: $P=1.28 \pm 0.78$ vs $C=5.24 \pm 1.64^{**}$; T45: $P=0.96 \pm 0.89$ vs $C=4.77 \pm 1.51^{**}$. Significancia: $*P < 0.05$; $**P < 0.01$. El perfusado se comportó como reservorio de D en ambos grupos. Excreción in vivo: Los grupos estudiados no presentaron diferencia significativa en cuanto a la excreción de D en bilis o al decaimiento plasmático. Conclusiones: La preservación en la función de la P-gp en el modelo in vivo, a pesar de su disminuida expresión, podría deberse a una suficiente capacidad del transportador remanente a nivel canalicular. La alteración en el transporte de D en HAP podría deberse a una mayor susceptibilidad de P-gp en los hígados intoxicados con APAP, por ej por depleción de sustancias antioxidantes plasmáticas o tisulares.

524. (3811) DETERMINACION SIMULTANEA DE 15 ACIDOS BILIARES SERICOS PARA LA EVALUACION Y DIAGNOSTICO DE PATOLOGIAS DE DISTINTO ORIGEN. MASRIAN, E; SCIOSCIA, S; FRANCHI, P; CASTAÑO, G; LEMBERG, A; CARDUCCI, C; LUCANGIOLI, S; TRIPODI, V

Cátedra de Química Analítica Cátedra de Fisiopatología, Fac. de Farmacia y Bioq. UBA. Consejo de Invest. del Gob. Ciudad BsAs

Los ácidos biliares séricos (ABS) son marcadores sensibles de colestasis. Se ha demostrado, además, la importancia de su determinación en otras patologías. Sin embargo, los métodos cromatográficos de referencia utilizados en el análisis individual de ABS (GC y HPLC) son costosos, complejos y requieren de pasos secuenciales. En los últimos tiempos, la electroforesis capilar (CE) se ha convertido en una metodología alternativa de gran versatilidad que combina las ventajas del microanálisis con una elevada selectividad. Utilizando la CE hemos desarrollado un método rápido y sencillo que permite la cuantificación simultánea de los ABS de mayor importancia clínica. Se han estudiado pacientes con disfunción renal tales como hemodializados con prurito (n=23), trasplantados de riñón (n=15), pacientes con colestasis gravídica (n=10), colestasis secundaria a hipertiroidismo (n=5) y controles séricos (n=27). Se observó elevación de ABS en todos los pacientes y cada patología estudiada presentó un perfil característico. El tiempo promedio de la realización del estudio fue de 50 minutos por muestra. Conclusiones: El método propuesto permite cuantificar los niveles de ABS y caracterizar el perfil de cada patología de manera rápida, sencilla, completa y simultánea, pudiendo ser utilizado de rutina en un laboratorio de mediana complejidad en la evaluación y diagnóstico de patologías de distinto origen.

525. (3955) EXPRESION DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASA LEUCOCITARIA (ISPL) EN LA MUCOSA INTESTINAL DE PACIENTES CELIACOS. PERIOLO, NATALIA; MAFFIA, PAULO; TATEOSIAN, NANCY; DEMERGASSO, MARIA JULIA; DE ROSA, SUSANA; CHULUYAN, EDUARDO; CHERNAVSKY, ALEJANDRA

Hospital de Clínicas "José de San Martín"-Servicio de Inmunogenética Hospital de Pediatría "J.P.Garrahan", Servicio de Gastroenterología

ISPL es una proteína anti-inflamatoria de 11,7 KDa presente en secreciones salivales, líquido seminal, mucus bronquial y en epitelio gastrointestinal. Esta proteína ejerce una potente acción inhibitoria de serino proteasas principalmente elastasa, cathepsina G, quimasa y quimioproteína. La acción inhibitoria de la proteólisis ejerce un control sobre el daño tisular en los sitios de inflamación. El objetivo de este trabajo fue corroborar la presencia de ISPL en el epitelio del intestino delgado normal y comparar su expresión y localización en el epitelio de pacientes celíacos con atrofia de la mucosa intestinal. Este estudio se realizó mediante una técnica de inmunohistoquímica sobre secciones de tejido fijados en formol y embebidos en parafina, provenientes de pacientes celíacos pediátricos (n = 4) e individuos con síntomas gastrointestinales no relacionados con enfermedad celíaca como grupo control (n = 4). El análisis de expresión de la proteína en el intestino normal evidenció una fuerte inmunomarcación a nivel de las criptas en las glándulas intestinales (score = 3), observándose una tenue marcación a nivel del epitelio superficial de la mucosa (score = 1). El análisis de las biopsias patológicas mostró una marcada disminución de la expresión de ISPL, más evidente a nivel de las criptas (score = 1) que en el epitelio superficial (score = 0). Estos resultados fueron corroborados mediante un análisis de Western blot en extractos proteicos de las biopsias intestinales. Se sugiere que el estado inflamatorio crónico característico de esta enfermedad estaría relacionado con un déficit en la producción de SLPI a nivel de la mucosa intestinal, confirmando a esta proteína un importante papel en la fisiopatología de la enfermedad celíaca.

HEMATOLOGIA IV

- 526. (3651) INFLUENCIA DEL VWF INTRAPLAQUETARIO EN LA PRESENCIA DE HEMORRAGIA MAYOR EN CIRUGÍAS.** WOODS, ADRIANA INÉS; NADAL, MARÍA VICTORIA; MESCHENGIESER, SUSANA SARA; BLANCO, ALICIA NOEMÍ; LAZZARI, MARÍA ANGELA

Academia Nacional de Medicina

La enfermedad de von Willebrand (VWD) es el desorden hemorrágico hereditario más frecuente, con expresión clínica variable. Examinamos nuestra población de pacientes (pts) con niveles de factor von Willebrand (VWF) bajos en relación a eventos quirúrgicos. Evaluamos si el VWF intraplaquetario (VWF-i) puede considerarse marcador predictivo de hemorragia mayor (HM) relacionada a cirugías. La población se agrupó según los siguientes criterios: grupo 1: VWF bajo (11-49 U/dL)+VWF-i normal, grupo 2: VWF bajo (11-49 U/dL)+VWF-i bajo (<0,1 U/109 plaquetas) y grupo 3: VWF normal+VWF-i bajo. Registramos datos de género, grupo sanguíneo y complicaciones hemorrágicas en cirugías previas al diagnóstico. HM incluye eventos fatales, o que requieren transfusión, hospitalización o re-intervención quirúrgica, hemorragias gastrointestinales, de SNC u oftálmicas (con ceguera). Resultados: Pts grupo 1: n=63; grupo O=70,4%; mujeres=65%; n° cirugías=88; HM=11/63 (17,4%); FVIII:C=47,0±20,6 U/dL; VWF:Ag=48,1±21,2 U/dL; VWF:RCo=38,8±7,5 U/dL; VWF-i=0,21±0,09 U/10(9) plaq. Pts grupo 2: n=19; grupo O=50,0%; mujeres=74%; n° cirugías=44; HM=2/19 (10,5%); FVIII:C=43,5±13,5 U/dL; VWF:Ag=43,2±11,3 U/dL; VWF:RCo=38,6±8,2 U/dL; VWF-i=0,07±0,01 U/10(9) plaq. Pts grupo 3: n=24; grupo O=70,1%; mujeres=75%; n° cirugías=45; HM=4/24 (16,6%); FVIII:C=60,9±25,6 U/dL; VWF:Ag=97,9±36,2 U/dL; VWF:RCo=85,9±30,8 U/dL; VWF-i=0,07±0,02 U/10(9) plaq. Los grupos resultaron comparables en género y grupo sanguíneo. Según el criterio de inclusión de los pts, se evidenciaron las diferencias del VWF y FVIII:C entre los grupos. No hubo diferencias en la incidencia de HM entre los pts con VWF-i normal y bajo (p=0,722). Los niveles intraplaquetarios del VWF no parecen definir el riesgo de sangrado en cirugías.

- 528. (3764) DISCORDANCIA ENTRE LOS NIVELES DE FACTOR VON WILLEBRAND (VWF) Y FACTOR VIII (FVIII) NO**

RELACIONADA CON HEMOFILIA NI CON LA VARIANTE 2N DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND. KEMPFER, ANA CATALINA; FARIAS, CRISTINA; SÁNCHEZ-LUCEROS, ANALÍA; AMARAL, MARÍA MARTA; GROSSO, SILVIA; CARBALLO, GONZALO; WOODS, ADRIANA; LAZZARI, MARÍA ANGELA

Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex". Academia Nacional de Medicina

Hemos detectado dos grupos de sujetos donde los niveles de VWF y FVIII presentan una evidente disociación. Estudiamos 8 embarazadas (E) del 3º trimestre donde el FVIII no ha aumentado tanto como el VWF:Ag y 5 pacientes con tendencia hemorrágica (H) donde la relación FVIII/VWF:Ag es mayor a 1.3. Para investigar si la discordancia observada se origina en defectos cuantitativos ó cualitativos del FVIII ó del VWF, se estudió el enlace del FVIII:Ag al VWF (VWF:FVIII) y el FVIII:Ag (endógeno) unido al VWF (VWF:FVIII) . Se calculó el índice de VWF:FVIII/VWF(1) y VWF:FVIII/VWF(2). Tabla: En E, 1 está dentro del rango normal y 2 es inferior; en H los índices 1 y 2 son superiores al rango.

Muestras	VWF:Ag (U/dL)	VWF:FVIII (U/dL)	1 (0.75-1.30)	VWF:FVIII (U/dL)	2 (0.80-1.20)
E1	194	181	0.90	96	0.49
E2	388	317	0.82	88	0.23
E3	296	312	1.05	85	0.28
E4	260	316	1.21	112	0.43
H1	62	86	1.39	78	1.26
H2	50	83	1.66	80	1.60
H3	38	52	1.37	65	1.71
H4	55	84	1.53	85	1.54
H5	47	66	1.40	67	1.42

En E se demuestra una anomalía cuantitativa del FVIII respecto al VWF. Existiría una anomalía cualitativa del VWF en los H que podría justificar su tendencia hemorrágica.

- 529. (3782) ANTIGENO DE VON WILLEBRAND INTRAPLAQUETARIO (VWF:AG-I) EN PACIENTES CON SANGRADO MUCOCUTANEO Y NIVELES NORMALES DE FACTOR DE VON WILLEBRAND PLASMÁTICO (VWF:AG).** NADAL, MV; BLANCO, AN; WOODS, AI; MESCHENGIESER, SS; GROSSO, SH; SALVIU, MJ; LAZZARI, MA

Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina

El VWF:Ag-i condicionaría la tendencia hemorrágica en la enfermedad de von Willebrand (EVW); en una serie previa (n=2339), detectamos 2,7% de pacientes con disminución de vWF:Ag-i y niveles normales de vWF:Ag y cofactor de Ristocetina (vWF:RCof). En un grupo seleccionado de pacientes con vWF:Ag plasmático normal y síntomas clínicos de EVW evaluamos el vWF:Ag-i y su correlación con: Tiempo de Sangría (TS, Ivy), vWF:RCof (McFarlane), FVIII (1-etapa) y Adhesividad Plaquetaria (Hellem II). La sangre fue recogida (9:1) en citrato de sodio 0,11M (FVIII); citrato trisódico 0,11M, 50mM EDTA, 60mM n-ethylmaleimida, 2000 KIU ml-1 aprotinina (vWF:Ag-i; vWF:Ag; vWF:RCof) o EDTA 53,7 mM (AP). vWF:Ag y vWF:Ag-i fueron determinados por inmunoelectroforesis (Laurell), al igual que el Fibrinógeno intraplaquetario (para descartar activación plaquetaria). El contenido intraplaquetario fue medido en el sobrenadante de plaquetas aisladas en gradiente de Ficoll-Paque, rotas por congelamiento-descongelamiento. Para el análisis estadístico se aplicaron tests no paramétricos. Doce pacientes (32%) mostraron vWF:Ag-i bajo, sugiriendo la presencia de EVW tipo intraplaquetario disminuido vWF:Ag-i. Hallamos correlación entre vWF:Ag-i y TS (rSpearman= -0,65; p=0,030), pero no con otros parámetros incluidos el vWF:Ag (rSpearman= -0,259; p= 0,352) y el vWF:RCof (rSpearman=0,026; p=0,926). En este grupo se-

leccionado de pacientes con síntomas hemorrágicos y datos sugestivos pero no confirmados de EVW la prevalencia del tipo intrplaquetario disminuido fue mayor que en series previas de pacientes con EVW no seleccionados. Además, el vWF:Ag-i correlacionó con el TS, sugiriendo que éste podría reflejar niveles disminuidos de vWF:Ag-i en pacientes con síntomas clínicos pero sin anomalías plasmáticas.

530. (3809) EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO EN LA FORMACIÓN Y LISIS DE REDES DE FIBRINA. LAURICELLA, ANA MARÍA; CASTAÑÓN, MARIA MERCEDES; GAMBA, CECILIA; USACH, VANINA; KORDICH, LUCIA

Depto. Qca. Biológica - Facultad de Cs. Exactas y Naturales - UBA

El dermatán sulfato (DS) es un glicosaminoglicano endógeno con acción anticoagulante; potencia al Cofactor II de la Heparina para inhibir trombina. **OBJETIVO:** Determinar el efecto del DS sobre redes de fibrina plasmáticas, evaluando la cinética de fibrinoformación, estructura y lisabilidad de las redes. Se obtuvo fibrina a partir de plasma normal con trombina bovina (0,8 U/ml) y cloruro cálcico (33 mM), en presencia de DS de alto peso molecular (4; 10; 20; 40; 100 µg/ml) y control sin DS. Las concentraciones indicadas son las finales en cada ensayo. Para estudiar la fibrinoformación se registró la densidad óptica (DO[405 nm]) vs. tiempo y se determinó: el tiempo de inicio de la coagulación (t coag), la velocidad de fibrinoformación (V[FF]) y la DO final. La estructura de las redes de fibrina se estudió por microscopía electrónica de barrido, se utilizó un analizador de imágenes (Image J) y se midieron (n campos = 30): porcentaje de red (% red), número de fibras por campo (N° fibras), ancho y largo de las fibras. Para estudiar la lisabilidad de la fibrina formada se agregó uroquinasa (50 U/well), se registró la DO[405 nm] vs. tiempo y se determinó el tiempo de lisis final.

RESULTADOS: Al aumentar la concentración de DS aumenta el tiempo de inicio de la coagulación, disminuye la V[FF], la DO final y el tiempo de lisis. Con DS 100 µg/ml el plasma no coaguló. En la tabla se indican los resultados para 40 µg/ml de DS (media ± desvío, n=3). Las redes con DS (4 µg/ml) mostraron igual N° fibras/campo, menor % red y ancho de fibra y mayor longitud.

	t coag (min)	V [FF] (min ⁻¹)	DO final	t lisis (min)	% red	N° fibras	Largo (nm)	Ancho (nm)
Control	1 ± 1	0,18 ± 0,03	1,5 ± 0,1	570 ± 30	Control 61 ± 3	60 ± 5	59,5 ± 1,7	35,4 ± 1,8
DS (40 µg/ml)	45 ± 3	0,08 ± 0,02	0,9 ± 0,1	176 ± 40DS	(4 µg/ml) 31 ± 3	57 ± 5	75,0 ± 1,1	24,3 ± 0,8

El DS retarda la fibrinoformación y modifica la estructura de la red, resultando redes heterogéneas, menos densas y más fácilmente lisables que el control.

531. (3833) REGULACION DE LA FUNCION PLAQUETARIA HUMANA POR NITROXILO. BERMEJO, EMILSE; FABIANA, ALBERTO; SARA, BARI; RUTH, ROSENSTEIN; DANIEL, SAENZ; MARÍA, LAZZARI

Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires Dpto. de Qca. Inorgánica, Analítica y Qca Física, FCEyN; Dpto. de Bioquímica Humana, F Medicina, UBA

Recientemente se ha sugerido que el producto primario de la reacción catalizada por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) no es el óxido nítrico (NO) sino la especie reducida (el nitroxilo, HNO) que puede oxidarse para generar NO por la acción de diversos oxidantes endógenos. El objetivo de este trabajo fue examinar, comparativamente, el efecto del HNO y el NO sobre la función plaquetaria. Para ello, se analizó el efecto de un dador de HNO (la sal de Angeli, SA) y de un liberador de NO, el nitroprusiato de sodio (SNP) sobre los siguientes parámetros: agregación plaquetaria (método turbidimétrico), liberación de ATP (bioluminiscencia); flujo de Ca²⁺ y marcadores de activación (citometría de flujo), y acumulación de GMPc (por RIA) en plaquetas humanas. Tanto el HNO como el NO inhibieron la agre-

gación plaquetaria inducida por ADP 5µM (% de agregación: control: 95 ± 2, SA: 11 ± 1,9, SNP: 13 ± 3) y la liberación de ATP (control: 2.8 ± 0.5, SA: 0.1 ± 0.5, SNP: 0.2 ± 0.1 µM ATP). Los niveles de los marcadores de activación CD62p y CD63 disminuyeron 65 ± 6%, 47 ± 5 %, para SA y SNP, respectivamente. Ninguno de ellos afectó la movilización de Ca²⁺. Ambos compuestos aumentaron los niveles de GMPc (basal: 2.5 ± 0.3, SA: 26.5 ± 0.4; SNP: 55 ± 5 nmol/10exp6 plaquetas). La cisteína inhibió y aumentó respectivamente el efecto de la SA y del SNP en la agregación plaquetaria, y en la acumulación de GMPc. Cuando la agregación plaquetaria se indujo con ditiotreitol, el SNP pero no la SA inhibió este parámetro (DTT: 41 ± 3, SA: 38 ± 3, SNP: 25 ± 3, % de agregación). Estos resultados indican que el HNO es un modulador de la función plaquetaria, probablemente a través de un mecanismo dual que involucra la activación de una guanilato ciclasa y cambios en el estado redox de los tioles de la integrina alfaIIbβ3.

532. (3873) REGULACION DE LA FUNCION PLAQUETARIA HUMANA POR NITROXILO. BERMEJO, EMILSE; ALBERTO, FABIANA; BARI, SARA; ROSENSTEIN, RUTH; SAENZ, DANIEL; LAZZARI, MARÍA

Academia Nacional de Medicina Dpto de Qca Inorgánica, Analítica y Qca Física, FCEyN, Dpto. de Bioquímica Humana, F Medicina, UBA

Recientemente se ha sugerido que el producto primario de la reacción catalizada por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) no es el óxido nítrico (NO) sino la especie reducida (el nitroxilo, HNO) que puede oxidarse para generar NO por la acción de diversos oxidantes endógenos. El objetivo de este trabajo fue examinar, comparativamente, el efecto del HNO y el NO sobre la función plaquetaria. Para ello, se analizó el efecto de un dador de HNO (la sal de Angeli, SA) y de un liberador de NO, el nitroprusiato de sodio (SNP) sobre los siguientes parámetros: agregación plaquetaria (método turbidimétrico), liberación de ATP (bioluminiscencia); flujo de Ca²⁺ y marcadores de activación (citometría de flujo), y acumulación de GMPc (por RIA) en plaquetas humanas. Tanto el HNO como el NO inhibieron la agregación plaquetaria inducida por ADP 5µM (% de agregación: control: 95 ± 2, SA: 11 ± 1,9, SNP: 13 ± 3) y la liberación de ATP (control: 2.8 ± 0.5, SA: 0.1 ± 0.5, SNP: 0.2 ± 0.1 µM ATP). Los niveles de los marcadores de activación CD62p y CD63 disminuyeron 65 ± 6%, 47 ± 5 %, para SA y SNP, respectivamente. Ninguno de ellos afectó la movilización de Ca²⁺. Ambos compuestos aumentaron los niveles de GMPc (basal: 2.5 ± 0.3, SA: 26.5 ± 0.4; SNP: 55 ± 5 nmol/106 plaquetas). La cisteína inhibió y aumentó respectivamente el efecto de la SA y del SNP en la agregación plaquetaria, y en la acumulación de GMPc. Cuando la agregación plaquetaria se indujo con ditiotreitol, el SNP pero no la SA inhibió este parámetro (DTT: 41 ± 3, SA: 38 ± 3, SNP: 25 ± 3% de agregación). Estos resultados indican que el HNO es un modulador de la función plaquetaria, probablemente a través de un mecanismo dual que involucra la activación de una guanilato ciclasa y cambios en el estado redox de los tioles de la integrina alfaIIbβ3.

533. (3876) DIAGNOSTICO FENOTIPICO DE LA PERSISTENCIA DEL PROPEPTIDO UNIDO AL FACTOR VON WILLEBRAND (PRO-VWF) EN PACIENTES CON EL ENLACE DEL FVIII AL VWF DISMINUIDO. CARBALLO, GONZALO AUGUSTO; KEMPFER, ANA CATALINA; ZURSCHMITTEN, ABEL BERNARDO; AMARAL, MARÍA MARTA; FARIAS, CRISTINA; LAZZARI, MARÍA ANGELA

Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex"

La mutación en el propéptido del VWF, Arg760Cys, provoca la disminución del enlace del FVIII al VWF (VWF:FVIIIb), variante 2P. El diagnóstico fenotípico se realiza detectando la banda (260kD) del pro-VWF, de baja intensidad, por SDS-PAGE, transferencia a nitrocelulosa y detección inmunoenzimática con anti-VWF. La mutación Arg763Gly también produce disminución del VWF:FVIIIb. Intentamos el diagnóstico fenotípico de 2P en pacien-

tes (p). Se analizaron 32p con VWF:FVIII B disminuido, 26 con VWF:FVIII B normal y VWF de la vía constitutiva de células endoteliales (para identificación). Se secuenciaron los p para detectar Arg760Cys y dos p para Arg763Gly. De los 32p sólo 7 dieron una banda de baja intensidad del pro-VWF. Los parámetros se observan en la Tabla. No se detectaron las mutaciones Arg760Cys y Arg763Gly.

Pacientes	VWF:Ag (U/dL) (50-100)	FVIII (U/dL) (50-150)	VWF:FVIII B (U/dL)	VWF: FVIII B/VWF: Ag (0.75-1.30)
1	110	7	17	0.15
2	117	20	33	0.28
3	112	70	64	0.57
4	185	25	8	0.04
5	148	20	47	0.32
6	180	42	93	0.52
7	110	84	61	0.55

La banda detectada como pro-VWF indicaría que: el pro-VWF de estos p están dentro del rango normal de la concentración basal en circulación ó que existen otras mutaciones no descritas. La banda de baja intensidad del pro-VWF, no confirmaría el diagnóstico de la variante 2P.

534. (3887) SUSTITUCIÓN R924Q EN UNA FAMILIA CON LEVE DISMINUCIÓN DEL ENLACE DEL FVIII AL VWF. CARBALLO, GONZALO AUGUSTO; WOODS, ADRIANA INÉS; KEMPFER, ANA CATALINA; FARÍAS, CRISTINA ELENA; AMARAL, MARÍA MARTA; LAZZARI, MARÍA ANGELA

Academia Nacional de Medicina Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. CONICET

La enfermedad de von Willebrand (VWD) se caracteriza por alteraciones cuali y/o cuantitativas del VWF. El tipo 2N de la VWD muestra disminución del enlace del FVIII al VWF (VWF:FVIII B) y del FVIII, con niveles normales de VWF:Ag, VWF:RCo y multímeros. Individuos homocigotas y heterocigotas compuestos presentan clínica similar a la hemofilia A. La sustitución R924Q en el gen que codifica para el VWF (exón 21) está descrita como polimorfismo (Hilbert et al, 2003). Sin embargo, la frecuencia del mismo no ha sido reportada. Describimos la sustitución R924Q en miembros de una familia con ligera disminución del VWF:FVIII B y niveles bajos de FVIII. Propósito: hombre de 48 años, diagnóstico previo de hemofilia A. Padece epistaxis, hematomas, hemorragia post extracción dentaria, hemartrosis y hemorragia mayor relacionada con cirugías. Respuesta al DDAVP: inadecuada. Hija: 26 años; hematomas fáciles. Respuesta al DDAVP: inadecuada. Nieta: 2 años; normal. Hijo: 24 años; hemorragia post extracción dentaria.

Parámetros	Rango Normal	Propósito	Hija	Nieta	Hijo
VWF:Ag (U/dL)	50-150	100	57	67	97
VWF:RCo (U/dL)	50-150	74	58	66	74
FVIII (U/dL)	50-150	21	43	50	50
TS (min) (Ivy)	menor de 4,5	5,5	3,5	-	1,5
VWF:FVIII B	-	leve disminución	normal	normal	leve disminución
Exón 21	-	R924Q	normal	normal	R924Q

La tendencia al sangrado y el VWF:FVIII B disminuido se correlacionarían con la presencia de la sustitución R924Q ya que la misma no fue detectada en 40 normales a pesar de haber sido descrita como polimorfismo.

535. (3905) PRESENCIA FISIOLÓGICA DE MULTÍMEROS EXTRAGRANDES DEL FACTOR VON WILLEBRAND

(VWF) CIRCULANTES EN RATONES BALB/C SANCHEZ-LUCEROS, ANALIA; KEMPFER, ANA CATALINA; NEPOMNASCHY, IRENE; FARÍAS, CRISTINA; AMARAL, MARÍA MARTA; PIAZZÓN, ISABEL; LAZZARI, MARÍA ANGELA

Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex"

Introducción: Las microangiopatías trombóticas son un grupo heterogéneo de enfermedades, infrecuentes, de presentación aguda y que requieren, debido a la mortalidad asociada, del inicio de un tratamiento precoz. Estas características han hecho difíciles los estudios dirigidos a explorar los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue explorar modelos murinos para el estudio del VWF y de la actividad de la proteasa que cliva al VWF (ADAMTS13). Material y métodos: Evaluamos ratones BALB/c, 10 machos y 10 hembras, vírgenes, de 8-10 semanas de edad. Utilizando anticuerpos anti-antígenos humanos, se evaluaron: VWF:Ag por ELISA, el patrón multimérico con cuantificación por densitometría, el efecto de ADAMTS13 sobre VWF purificado humano con detección por VWF:CB y el FVIII:Ag unido al VWF por ELISA. Los resultados obtenidos en ratones (A) y en humanos (B), se muestran en la tabla. No se observaron diferencias por sexo. El FVIII:Ag unido al VWF en 5 machos y 4 hembras; resultó en todos los casos menor al 26%.

Porcentaje	n° de muestras	A: Rango (media±DE)	n° de muestras	B: rango
VWF:Ag	8	7-23 (16±6)	27	55-223
ADAMTS 13	9	30-50 (38±6)	17	66-100
Multímeros extragrandes del VWF	11	0-45 (26±16)	15	-5-15

Conclusiones: En nuestro conocimiento este trabajo brinda los primeros datos de la actividad de ADAMTS13 en ratones. Inesperadamente, 74% de los ratones muestran un alto porcentaje de multímeros extragrandes circulantes. La menor concentración de ADAMTS13, que induciría un mayor porcentaje de multímeros extragrandes circulantes, podría explicar la mayor frecuencia de trombos a edad madura en la cepa BALB reportada previamente por otros autores.

INFECTOLOGIA II

536. (3370) HEPATITIS CRÓNICA POR HCV EN NIÑOS. HALLAZGOS HISTOLÓGICOS Y GENOTIPIFICACIÓN. PRECIADO, MARIA VICTORIA; GISMONTI, M INÉS; MARCO, IRENE; DE MATTEO, ELENA

Laboratorio de Virología, Div Anatomía Patológica Htal Niños R Gutierrez

La hepatitis crónica (HC) por virus de Hepatitis C (HCV) en la infancia es una enfermedad fibrótica progresiva que puede evolucionar a la cirrosis. Es asintomática en el 85% de los casos. Los aislamientos de HCV se clasifican en 11 genotipos, agrupados en 6 clades. Nuestro objetivo fue evaluar y correlacionar la distribución del genotipo viral, el daño hepático inicial y los niveles de ALAT en pacientes pediátricos. De un total de 26 niños con infección por HCV confirmada por detección de anticuerpos y ARN viral, se estudiaron 20 casos de los cuales se contaba con biopsia hepática inicial. Se extrajo el ARN total de plasma y se amplificó un fragmento de 251 pb de la región 5' no codificante, que se digirió con enzimas de restricción para determinar el genotipo viral por RFLP. En la biopsia se evaluó la actividad necroinflamatoria y el estadio de fibrosis graduados según el índice de Knodell modificado, la presencia de esteatosis, daño de conductos biliares y folículos linfoides. La distribución por edad

fue de 1-16 años (mediana: 8 años) y por sexo fue 1:1. La vía de infección fue: 14 parenteral, 5 vertical y 1 desconocida. El análisis de genotipos mostró: 1a/c: 13 casos, 1b: 5 casos, 1 no tipificable (NT): 1 caso, 4: 1 caso. El nivel de ALAT fue elevado en 12 niños y normal en 8. Se observaron 7 HC leve (4 ALAT normal), 12 moderada (4 ALAT normal) y 1 severa. La fibrosis fue en 7 casos leve (3 ALAT normal; 3 1a/c, 3 1b, 1 1NT), 9 moderada (4 ALAT normal; 7 1a/c, 2 1b) y 4 severa (3 1a/c, 1 4). No se observó cirrosis. Se halló esteatosis en 12 casos, daño de conductos biliares en 17 y folículos linfoides en 11. El genotipo viral no correlacionó con el estadio fibrótico. El 60% de esteatosis y el 85% de daño de conductos biliares podrían relacionarse con un efecto citopático viral. Todos los pacientes con ALAT normal presentaron HC y distintos grados de fibrosis.

537. (3373) AISLAMIENTOS DEL VIRUS DE HEPATITIS C CON UN NUEVO PATRÓN DE RESTRICCIÓN ASOCIADO A GENOTIPO 1 EN ARGENTINA. GISMONDI, MARIA INES; STAENDNER, LOTHAR; GRINSTEIN, SAÚL; GUZMAN, CARLOS; PRECIADO, MARIA VICTORIA

Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez Vaccine Research Group, Div. Microbiology, GBF-German Res. Centre Biotechnol., Braunschweig, Germany

El virus de hepatitis C (VHC) es un ARN virus cuyo genoma está delimitado por regiones no codificantes (5'NC y 3'NC). Los aislamientos se clasifican en 11 genotipos, agrupados en 6 clades. Los genotipos virales se utilizan como marcador pronóstico de la respuesta al tratamiento con interferón. Nuestro objetivo fue realizar el análisis filogenético de aislamientos de VHC que presentaron un genotipo indeterminado. Se estudiaron 4 pacientes pediátricos (de un total de 28) y un adulto con infección crónica por VHC que presentaron un patrón de restricción atípico en la determinación de genotipo. Se extrajo el ARN total de muestras de plasma y amplificó un fragmento de 251 pb de 5'NC. Los amplicones fueron digeridos con enzimas de restricción para la determinación del genotipo viral por RFLP. Se determinó la secuencia nucleotídica de ellos y se realizó el análisis filogenético por comparación con aislamientos de VHC del GenBank. El patrón de restricción atípico en las muestras en estudio fue confirmado por secuenciación que reveló una sustitución G por A en la posición -235 de 5'NC, responsable de un sitio de reconocimiento adicional para la enzima RsaI. El análisis filogenético mostró un agrupamiento de nuestros aislamientos con cepas prototípicas de genotipo 1, aunque integrando un subgrupo distinto de los subtipos a, b y c ya descriptos. Nuestras muestras y otros aislamientos de genotipo 1 de Uruguay, Costa Rica, Chile y Brasil presentaron mayor similitud entre sí que respecto de cepas de VHC genotipo 1 reportadas en otros continentes. Estos resultados demuestran una diversificación del VHC en nuestra región e indican que nuestras muestras con el patrón de restricción atípico deben ser clasificadas como genotipo 1.

538. (3398) INFECCIÓN IN VITRO DE ASTROCITOS DE RATÓN Y DE RATA CON EL VIRUS POLIOMA MURINO. PONTILLO, CAROLINA; BERRÍA, MARÍA ISABEL; SANJUAN, NORBERTO

(UBA) Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA

Los virus Polioma murinos pueden, in vitro, lisar fibroblastos de ratón y transformar fibroblastos de rata e, in vivo, inducir neoplasias en ratones. No obstante, ninguna de esas neoplasias se origina en el sistema nervioso central y la inoculación intracerebral de Polioma en ratones tampoco induce neoplasias ni infecciones líticas. En función de estudiar si lo observado en el ratón se debe a la incapacidad del Polioma para infectar células pertenecientes al sistema nervioso central o si, por el contrario, es debido a la imposibilidad del virus de alcanzar el encéfalo, se desarrolló un modelo experimental in vitro en base al

primer subcultivo de astrocitos de embriones de ratón y de embriones de rata en cubreobjetos de vidrio colocados dentro de placas de Petri plásticas, con DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. A las 0, 24 y 48 horas post-infección (pi) se fijaron los cubreobjetos en metanol y se detectaron por inmunofluorescencia indirecta la proteína mayor de la cápside viral (VP-1), el producto del oncogén viral (mT) y GFAP (proteína gliofibrilar ácida de astrocitos). Se observó que los astrocitos de ratón tenían marcación intranuclear e intracitoplásmica positiva para VP-1 y marcación citoplásmica positiva para mT a partir de las 24 hs pi. Asimismo, el patrón de expresión de GFAP en las células infectadas era aberrante. Esta marcación colocalizaba con la de VP-1. Se observaron partículas virales por microscopía electrónica y se recuperó virus a partir de las células infectadas por cultivo en monocapas de células NIH-3T3. Los astrocitos de rata infectados con Polioma, en cambio, mostraron sólo marcación citoplásmica de mT y no se detectó virus infectivo en estas células. Se concluye que Polioma puede infectar en forma lítica astrocitos de ratón y en forma abortiva astrocitos de rata, de modo que la ausencia de infección intracerebral y el no desarrollo de neoplasias neurales dependería de otros factores locales presentes en el encéfalo o de la incapacidad del virus para atravesar la barrera hemato-encefálica.

539. (3413) MAYOR RECUPERACIÓN DE HCV EN CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DE PACIENTES HCV+ LUEGO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON HIV. PARODI, CECILIA; BARÉ, PATRICIA; BELMONTE, LILIANA; MASSUD, IVANA; MARTÍNEZ, ANA; DE CAMPOS NEBEL, MARCELO; E. DE BRACCO, M. MARTA; RUIBALARES, BEATRIZ

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina; Hospital Juan A. Fernández, BsAs

La presencia del virus de la Hepatitis C (HCV) en células mononucleares periféricas (CMP) ha sido ampliamente documentada a pesar de que la importancia de su replicación en las mismas es aún discutida. En pacientes co-infectados (HIV-HCV) se observa una mayor replicación de HCV por una probable influencia directa o indirecta del HIV. Para profundizar en el estudio de las interacciones entre ambos virus se realizaron ensayos de infección con HIV sobre cultivos de CMP de pacientes con infección crónica para HCV (n=6). Se compararon las cargas virales de HCV alcanzadas con y sin la presencia de HIV sobre las mismas. Las infecciones con HIV se realizaron a los 6 días incubando durante 16 horas las CMP con sobrenadantes (SN) HIV+ cuantificados por ensayos de antígeno p24 (Biomérieux). Se realizaron mediciones de p24 y cuantificación de HCV (Amplicor HCV Monitor) en los SN, a lo largo de los distintos días de cultivo, tanto en los cultivos infectados como en los controles sin infectar. La infección con HIV logró aumentar la carga de HCV significativamente hasta un valor máximo de 265400 ± 39810 UI/ml que supera en 2 log el valor máximo alcanzado por el cultivo sin infección; además prolonga la persistencia de HCV en el cultivo (60 días, carga viral HCV: 24124 ± 3619 UI/ml). Es notable la diferencia con los controles sin infección donde el valor máximo fue 7340 ± 1468 UI/ml y la replicación no superó el día 19. En los pacientes HCV+ con cultivos RNA HCV-, la negatividad persistió pese a la infección por HIV. Solo algunos individuos con infección crónica por HCV poseen RNA-HCV en sus CMP. La presencia concomitante de HIV en este reservorio celular exacerba la replicación. El modelo puede ser útil para dilucidar las interacciones entre ambos virus.

540. (3517) AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-1 EN RATONES INFECTADOS CON VIRUS HERPES SIMPLEX-1. GONZALEZ, MARÍA INÉS; RUBINSTEIN, NATALIA; TOSCANO, MARTA; ILARREGUI, JUAN; RABINOVICH, GABRIEL; SANJUAN, NORBERTO

Facultad de Medicina (UBA) Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina (UBA)

Anteriormente reportamos que, luego de la infección de cultivos de células Vero por virus Herpes simplex-1 (HSV-1), se observaba un aumento de la síntesis de Galectina-1 (Gal-1) comparado con los controles no infectados. Esto fue interpretado como un mecanismo de escape inmunológico de HSV-1, ya que Gal-1 tiene efectos pro-apoptóticos sobre los linfocitos T CD8+. Con el objeto de comprobar si el mismo fenómeno ocurre en la infección animal se inocularon ratones Balb/c lactantes por vía intralabial con 5×10^5 ufp de HSV-1 de la cepa MacIntyre. A los 2, 4, 6 y 8 días post-infección (pi) los animales fueron sacrificados y las cabezas fueron fijadas en líquido de Bouin, decalcificadas con EDTA acuoso al 5% y procesadas para su inclusión en parafina. Otros grupos no infectados fueron empleados como controles negativos. Se realizaron cortes seriados y en cada uno de ellos se estudiaron las alteraciones histológicas y se detectó la expresión de Gal-1 y de antígenos de HSV-1 por inmunoperoxidasa utilizando sueros primarios contra cada antígeno. La metodología consistió en marcar un corte histológico contra HSV-1 y el corte inmediato posterior contra Gal-1. Dado que los cortes median 5 μ m, las mismas células podían ser estudiadas en el corte adyacente. Se demostró la presencia de antígenos de HSV-1 a partir de los 2 días pi en el epitelio bucal, en los nervios de las ramas del trigémino, en ganglios nerviosos y en las células musculares de la lengua. La marcación de antígenos de HSV-1 fue intranuclear aunque también se observó marcación intracitoplasmática en las neuronas. En las mismas células infectadas se observó un aumento en la intensidad de la marcación contra Gal-1, comparada con la detectable en células no infectadas del mismo animal. Se concluye que en la infección del ratón por HSV-1 se detecta un aumento de la expresión de Gal-1 en las células infectadas. Es posible, entonces, que HSV-1 utilice este mediador como facilitador de la primoinfección viral.

541. (3595) INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV) POR LA PRESENCIA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS G (HGV) IN VITRO. MASSUD, IVANA; BARÉ, PATRICIA; DE TEZANOS PINTO, MIGUEL; BELMONTE, LILIANA; PARODI, CECILIA; CORTI, MARCELO; E DE BRACCO, M MARTA; RUIBAL ARES, BEATRIZ

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Fundación Argentina de la Hemofilia. Buenos Aires.

La presencia del virus de la Hepatitis G (HGV) en pacientes HIV+ se asocia con una menor progresión a SIDA. Considerando ensayos anteriores en los cuales detectamos el genoma de HGV (RNA HGV) en células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes con viremia HGV+, se evaluó el impacto del HGV en la replicación de HIV a través de ensayos de infección in vitro. Se aislaron CMP de 4 donantes sanos y se infectaron respetando el siguiente esquema: Tubo A, 750 μ l de plasma HGV+ (1x10⁶ copias/ml); Tubo B, 1 ml de sobrenadante (SN) HIV+ (1000 pg/ml de antígeno p 24) y Tubo C, 1ml SN HIV+ (1000pg/ml); después de 24hs, 750 μ l plasma HGV+. Las CMP infectadas (tubos A,B,C) y sin infectar (tubos control) se mantuvieron en cultivo sin estímulo exógeno. Luego de distintos días de cultivo, se determinó en los SN, la presencia de RNA HGV por retrotranscripción y amplificación de la región NS5b del virus. Además, se midió el antígeno p24 del HIV por medio de una técnica de Elisa (Biomérieux). 3 de los 4 cultivos resultaron RNA HGV+ hasta el día 15 de cultivo. Se detectó infección por HIV en todos los cultivos (valor máximo promedio) p24: 2310 \pm 209.5 pg/ml en CMP infectadas con ambos virus y p24: 4316 \pm 16.0 pg/ml en las infectadas solo con HIV. Esta diferencia en la concentración de p24 fue significativa ($p < 0.01$). Asimismo, en el cultivo en el cuál no se detectó RNA HGV se observó una menor replicación de HIV. Nuestros resultados indican que HGV inhibe la replicación de HIV in vitro. Esto podría ser el resultado de la acción directa del HGV sobre HIV-1 en los linfocitos T CD4+ o por inducción de citoquinas y/o alteración de la expresión de los receptores de la misma.

542. (3801) INFECCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS POR HIV DE DIFERENTE TROPISMO EN CULTIVOS CELULARES NO ESTIMULADOS. DE CAMPOS NEBEL, MARCELO; PARODI, CECILIA; BELMONTE, LILIANA; BARÉ, PATRICIA; RUIBAL-ARES, BEATRIZ

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Recientemente desarrollamos un sistema de cultivo prolongado de células mononucleares sin estímulo exógeno (CPSE) que resultó útil para detectar replicación persistente por HIV macrotropico (R5) en pacientes HIV positivos. En este trabajo se determinó la capacidad de aislados primarios virales R5 o linfotrópicos (X4) para infectar macrófagos (M) o linfocitos CD4+ (L) de dadores normales (n=3) en CPSE. Se estudió la cinética de replicación del HIV en M y L (200 células por fenotipo) por microscopía de fluorescencia (doble marcación pNef / CD4 o CD64) y la producción de p24 en sobrenadante de cultivo (SN) por ELISA. Se ensayó la infectividad de SN X4 o R5 (p24 1ng/ml) sobre M o L en CPSE (2X10⁶) células/ml y por tubo, por triplicado). Las muestras se analizaron los días 16, 21 y 28 de cultivo. Los cultivos infectados con X4 mostraron replicación tanto en M (entre 29 y 45%) como en L (entre 21 y 39%) a los diferentes tiempos. La replicación en M y L se incrementó con el tiempo de cultivo. La producción de p24 en SN fue elevada a los días 16 y 21 (3,1 y 2,8 ng/ml) descendiendo hacia el día 28 (1,4 ng/ml) mientras que la positividad para pNef intracitoplasmática ascendió hasta el día 28. El rango de replicación del X4 en M y L fue similar. A diferencia de esto, la replicación del R5 involucró principalmente M. Sin embargo, se observaron diferencias individuales en el rango de replicación. Los resultados indican que el X4 infecta tanto L como M en CPSE. La producción de p24 en SN desciende hacia el final del cultivo aunque grandes cantidades de virus siguen siendo detectadas en el interior celular. Los resultados confirman que en CPSE predomina la infección de M no solo cuando el virus infectante es R5 sino también con cepas X4.

543. (3904) LA ACCIÓN CITOPÁTICA DEL VIRUS JUNIN SOBRE CÉLULAS VERO SE RELACIONA CON LA APOPTOSIS Y NECROSIS. RIVA, DIEGO ARIEL; SACCA, PAULA; RÍOS DE MOLINA, MARÍA DEL CARMEN; COULOMBIÉ, FELIX CARLOS; MERSICH, SUSANA ESTHER

Depto de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. Argentina.

La infección de células Vero con virus Junin (VJ), agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina, exhibe una etapa inicial virulenta, caracterizada por una acción citopatogénica (ACP) con destrucción celular y producción de virus al sobrenadante. La inducción de apoptosis en la célula hospedadora es un aspecto importante de la patogénesis viral en muchas infecciones con virus ARN, en algunas de las cuales, la activación de los pasos apoptóticos determina el redondeamiento celular, característico de la ACP. El objetivo de este trabajo es determinar si la inducción de apoptosis es un evento presente en la ACP de VJ sobre células Vero. Para ello, se analizaron en células Vero infectadas con la cepa atenuada XJ-Cl3 (moi=1) los siguientes parámetros: (a) la morfología nuclear, mediante una tinción con Hoechst, (b) la fragmentación intranucleosomal por electroforesis en gel de agarosa, (c) la modulación de Bcl-2 por un western blot, (d) la participación de un estrés oxidativo a través de la medida de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Los resultados mostraron (a) la presencia de núcleos apoptóticos a las 24 hs p.i., (b) la presencia de fragmentos a partir de las 48 hs p.i. y una tinción difusa de ADN a las 92 hs p.i., (c) la expresión no alterada de los niveles de Bcl-2, (d) la inducción de estrés oxidativo a las 48 hs p.i. Los resultados sugieren que la activación de un programa de muerte a las 24 hs p.i., un estrés oxidativo a las 48 hs p.i. y la necrosis presente a las 96 hs p.i., se relacionarían con la ACP observada en las células Vero infectadas con VJ.

544. (3910) GENOTIPOS DE VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO EN INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS. VIEGAS, MARIANA; MISTCHENKO, ALICIA S

Laboratorio de Virología. Hospital de Niños R. Gutiérrez

La glicoproteína G del Virus Sincicial Respiratorio (VSR) presenta amplia diversidad genética lo cual permite identificar genotipos prevalentes y ampliar el conocimiento sobre los patrones de circulación viral. Con el fin de conocer los genotipos que circularon en los últimos cinco años (1999-2003) se analizaron 17.983 aspirados nasofaríngeos de niños hospitalizados en la ciudad de Buenos Aires por infección respiratoria aguda baja. El VSR fue detectado en 5556 aspirados nasofaríngeos (30,8%). El gen de la glicoproteína G fue amplificado por RT-PCR y analizado por RFLP en 350 cepas. El subgrupo A predominó en tres estaciones invernales (1997, 2001 y 2003) mientras que el grupo B en dos (1999-2002). El análisis de la secuencia del ectodominio de la glicoproteína G mostró 588 mutaciones puntuales: 449 sinónimas y 139 no sinónimas, entre estas 131 se encontraron en sitios polimórficos. El análisis filogenético del C-terminal de la proteína G agrupó las cepas del subgrupo A en dos genotipos: GA2 el cual predominó en 1997, 1999, 2001 y 2002 y el GA5 que predominó en los años 2000 y 2003. La periodicidad anual de los cambios en la glicoproteína G podrían contribuir a la capacidad del VSR a causar brotes epidémicos anuales.

545. (4000) NIVELES DE IL8 Y TNFA EN SOBRENADANTE DE CULTIVO (SC) DE PMN Y CMN DE PACIENTES TUBERCULOSOS (TB) CON Y SIN ESTÍMULO DE M. TUBERCULOSIS (H37RV) INACTIVADO. RATENI, L **; FIORENZA, G **; FARRONI, M A *; NEUMAN, M *; TABORDA, M **, DLUGOVITZKY, D **

() Hospital Carrasco de Rosario. (**) Sección Inmunología. Cat. Microbiología. Facultad Ciencias Médicas. UNR*

Anteriormente se investigó en pacientes TB la funcionalidad de PMN y CMN cultivados y estimulados con H37Rv, determinando por C de Flujo la capacidad oxidativa, CD11b y receptores para TNF e IL8 de tales células. El estudio se completó con la evaluación de los niveles de IL8 y TNFa en el sobrenadante de cultivo, que se comunica ahora. Se estudiaron 9 pacientes TB sin tratar (HIV-) y 9 controles sanos (Co) similares en sexo y edad (edad media 36±13.5 años, DS). PMN y CMN se cultivaron 20 hs, con y sin estímulo (E, B), con M.tuberculosis (H37Rv) inactivado. Las citocinas se cuantificaron por ELISA (R&D). Resultados: media± e.s (pg/ml). TNF: P: CMNB: 2968.8 ±176.83; CMNE: 5147.23 ±314.58 (p<0.02); PMNB: 1119.3 ±314.92; PMNE: 2625.38 ±136.51 p<0.01 Co: PMNB: 405.7±46.06; PMNE: 1634.8 ±89.33 (p<0.05). CMNB: 806.9±75.4 CMNE: 3273. CMNB P vs Co: p<0.03. CMNE P vs Co: p<0.01; PMNB P vs Co: p<0.04. PMNE P vs Co: p<0.01 IL8: P : CMNB: 15914.84±1009.2; CMNE: 41252.88±956.3 (p<0.004). PMNB: 10313±1547.1; PMNE: 18480.41±1254.0 (p<0.01). Co: CMNB: 15896±934.32; CMNE: 31256.5±854.31 (p<0.001). PMNB: 4263.6± 850.62; PMNE: 7244.8±834. (p<0.05). CMNB P vs Co: p<0.001 CMNE P vs Co: p<0.05; PMNB P vs Co: p<0.05; PMNE P vs Co: p<0.05. Conclusiones: La producción basal de TNFa por CMN y PMN fue superior en pacientes que en controles y lo mismo ocurre con la producción de IL8 por PMN. Luego del estímulo con H37Rv la producción de ambas citocinas se incrementó en sobrenadante de cultivo de ambos tipos celulares tanto de pacientes como controles, pero en los primeros el fenómeno fue más marcado, ya que en los pacientes los valores fueron significativamente superiores a los del grupo control. En ambos casos las CMN producen mayor concentración de citocinas que los PMN.

546. (4001) EFECTO DEL ESTÍMULO CON M. TUBERCULOSIS (H 37RV) INACTIVADO SOBRE LA CAPACIDAD OXIDATIVA MÁXIMA Y EXPRESIÓN DE CD11B EN PMN Y CMN DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR (TB) EN CULTIVOS CORTOS. FIORENZA,

G; FARRONI, MA*; AITA, J*; BOGUE, C*; DLUGO-VITZKY, D****

**Hospital Carrasco - Rosario **Sección Inmunología. Cat. Microbiología. Fac. Ciencias Médicas. UNR*

Se estudió funcionalidad de PMN y CMN en pacientes TB estimulados o no con H37Rv. Anteriormente se presentaron datos parciales de CD11b y receptores para TNF e IL8 de PMN cultivados 20 horas. Se comunican ahora resultados del estímulo con H37Rv sobre capacidad oxidativa máxima (COM) y expresión de CD11b en PMN y CMN de pacientes TB (P) y controles (Co) en cultivos cortos. Se estudiaron 9 pacientes TB sin tratar (HIV-) y 9 controles sanos (Co) similares en sexo y edad (edad media 36±13.5 años, DS). PMN y CMN se cultivaron 4 y 20 hs, con y sin estímulo (B, E), con M.tuberculosis (H37Rv) inactivado. Los datos de COM y CD11b se obtuvieron por C. de flujo. Se expresaron por IFM con/sin estímulo y CD11b en % de cel e IFM (media±ES). Resultados: CD11b: CMN: % cel: CoB: 40.08±6.39; CoE: 13.95±5.89; PB: 29.08±4.47; PE: 8.99 ±3.54. IFM: CoB: 194.51±58.3; CoE: 84.6±32.6 (p<0.008). PB: 206.0±43.52. PE: 38.93±8.82 (p<0.002). PMN: % cel: CoB: 92.64±2.99. CoE: 38.08±10.6 (p<0.0001). PB: 87.3±8.58; PE: 44.06±14.39 (p<0.002). IFM: CoB: 642.24±119.13. CoE: 106.3±27.81 (p<0.0006). PB: 614.09±143.72; PE: 87.05±27 (p<0.002). 20hs: CMN: %cel: CoB: 34.13±2.98; CoE: 6.66±2.84 (p<0.0001). PB: 29.01±5.72; PE: 6.44±3.22 (p<0.003). IFM: CoB: 154.8±30.62; CoE: 40.97±10.45 (p<0.003). PB: 198.76±51.65; PE: 45.78±8.59 (p<0.001). PMN: % cel: CoB: 72.88±12.77; CoE: 69.04±67.99. PB: 81.24±6.58; PE: 1.78±0.63 (p<0.0001). IFM: CoB: 414.23±63.63; CoE: 229.43±62.4. PB: 373.57±40.69; PE: 68.88±11.66 (p<0.0001). Conclusiones: La respuesta oxidativa al estímulo de CMN y PMN en Co y P cultivadas 4 hs fue similar. Las CMN de Co cultivadas 20 hs y estimuladas duplican su capacidad oxidativa. La de los P no se altera. La expresión de CD11b (% y MFI) en CMN y PMN tanto de Co como P se inhibe por el estímulo.

ONCOLOGÍA VI

547. (3255) ROL DE LOS MASTOCITOS EN LA TUMORIGENICIDAD DE DOS ADENOCARCINOMAS MAMARIOS MURINOS. BOCHOEYER, DIEGO; GLEISER, MARCELA; PURICELLI, LYDIA; LAURIA DE CIDRE, LILIA

Dto BBE, FCEyN, UBA. Area de Investigación, Inst. Oncología A H Roffo, UBA.

Los mastocitos (MC) abundan en patologías tumorales y liberan mediadores químicos que pueden modular distintas etapas de la progresión tumoral. Objetivo: Evaluar la influencia de los MC en el crecimiento in vivo e in vitro de las líneas tumorales (LT) LM3 y F3II de baja y alta capacidad invasiva local, derivadas del mismo adenocarcinoma mamario murino. Cuantificamos in vivo el número de MC reclutados espontáneamente por las LT, en cortes histológicos de los tumores sc de distinto tiempo de portación. Al día 18 de portación tumoral, F3II recluta mayor número de MC/2.4mm² que LM3 (52.5±3,5 vs 31,5±0,7). Coinyectando las LT conjuntamente con MC, evaluamos la tasa de crecimiento tumoral, latencia e incidencia metastásica. Los MC aumentan en F3II la tasa de crecimiento en 271,4±36,7% disminuyendo la latencia de 9 a 6 días. En LM3 disminuyen su tasa de crecimiento en 47,38±9,2% y no modifican la latencia. La incidencia metastásica no se modifica. Estudiamos la acción de los MC en la proliferación in vitro de las LT por recuento celular, y sólo la LM3 muestra una disminución en 42,3±7,4%. Observamos en los cocultivos de ambas LT con MC en relación 1MC:5CT y 1MC:10CT: 1-por zimografía cuantitativa, un aumento en los niveles de MMP de 142,6±23,3% para la F3II y 335,4±84,1% para la LM3, y 2-por caseinólisis radial, una inhibición del uPA a niveles no detectables. Los datos presentados fueron significativos con p<0.05. Los co-cultivos de ambas LT con los MC inhiben la producción de uPA y aumentan la de MMPs. Sin embargo

modulan diferencialmente el crecimiento tumoral. Por lo tanto, su acción no es consecuencia solamente de los mediadores químicos que liberan sino también del fenotipo de las células sobre las que ejercen su acción.

548. (3285) COMBINACIÓN DE DOS COMPUESTOS BORADOS (BPA Y BOPP) EN LA APLICACIÓN DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) AL CÁNCER INDIFERENCIADO DE TIROIDES (CIT). DAGROSA, MARIA ALEJANDRA; VIAGGI, MABEL; JIMENEZ REBAGLIATI, RAUL; BATISTONI, DANIEL; KAHL, STEPHEN; JUVENAL, GUILLERMO; PISAREV, MARIO

Comision Nacional de Energía Atómica(CAC) Depto de Bioquímica, Fac. de Medicina, UBA. Depto de Química Farmacéutica, Universidad California

En trabajos previos hemos demostrado la factibilidad de aplicación del BNCT al tratamiento del CIT. Utilizando el compuesto borofenilalanina (BPA), concentrado en una cantidad de 24 µg/g de tejido tumoral (ppm), hemos logrado un 50% de cura de animales portadores de CIT. Con el objetivo de aumentar la cantidad de boro en el tumor y así mejorar el resultado de la técnica, se analizó la biodistribución de la porfirina borada BOPP sola y en combinación con el BPA. Se utilizaron ratones NIH nude implantados con células de la línea de CIT humano ARO. El boro fue analizado en el tumor y otros tejidos por el método de ICP-AES. Además se estudio la ubicación subcelular del BOPP mediante ruptura mecánica y centrifugaciones a distintas velocidades en buffer (0,32 M Sacarosa, 0,4 mM PO₄Na, 1mM MgCl₂) pH 7,4. Cuando los animales fueron inyectados con el BOPP solo y sacrificados a las 24hs, no se observó una captación selectiva por el tumor en ninguna de dos dosis (10 o 100mg/Kg) ni de dos vías de administración (i.p o i.v). Por el contrario cuando los ratones fueron inyectados de forma i.p con BOPP (60 mg/Kg) y 1-7 días más tarde con BPA (350 mg/Kg), sacrificándose a la hora, se observó un pico de boro en el tumor a los 5 días, lograndose una concentración de 45 ppm. A ese tiempo, la cantidad de boro en los demás tejidos fue baja, alcanzándose relaciones de 3,75 con la sangre (p<0.001) y de 2 con la piel circundante al tumor (p<0.001). Por otro lado los estudios de fraccionamiento celular mostraron que la más alta concentración de la porfirina borada se halla en el pellet de 11.500 G (enriquecido con mitocondrias). Los estudios realizados mostraron que con la combinación de los compuestos borados se logra una mayor cantidad de boro en el tumor comparado al BPA solo (45 ppm Vs 24ppm), abriendo la posibilidad de optimización de la técnica de BNCT para el tratamiento del CIT.

549. (3424) DESARROLLO DE PILOMATRIXOMAS INDUCIDOS POR EL VIRUS POLIOMA EN RATONES. VILLÁN OZUNA, PAOLA; SANJUAN, NORBERTO

Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina, UBA.

En una comunicación anterior reportamos que el virus Polioma murino es capaz de inducir tumores del folículo piloso caracterizados como Pilomatrixomas. El propósito de este trabajo fue estudiar la progresión del desarrollo de este tipo de tumores, desde el momento de la inoculación del virus hasta la detección clínica de estas neoplasias y, particularmente, la presencia de virus infectivos intratumorales. Se inocularon por vía subcutánea ratones neonatos de la cepa C3H BiDa con 10(5) ufp de la cepa A2 del virus Polioma murino. A los 5, 10, 15, 20, 40, 55 y 70 días post-infección (pi) se sacrificaron 5 animales por tiempo de estudio, y otros tantos animales de control, no infectados. Parte de la piel de cada ratón fue incluida en parafina y el resto fue procesada para microscopía electrónica o congelada. Sobre los cortes histológicos se detectó la presencia del virus por inmunoperoxidasa contra la proteína mayor de la cápside viral, VP-1, y los preparados fueron contrastados con hematoxilina. La presencia de virus en la piel fue determinada por titulación a partir de homogenatos de piel y comparada con la cantidad de virus

presente en otros tumores, como los adenocarcinomas de mama y de parótida. Se observó que a partir del día 10 pi Polioma replica en las células matriciales del folículo piloso hasta la aparición de pilomatrixomas microscópicos en el día 55 pi. En los tumores plenamente desarrollados se encontró virus en las células matriciales, en las células "sombra" y en la queratina. Por microscopía electrónica se observaron abundantes partículas de Polioma en las células de los pilomatrixomas y en la queratina. El título de Polioma en los pilomatrixomas fue al menos 1 logaritmo mayor al detectado en adenocarcinomas de mama y de parótida. Se concluye que, a diferencia de lo observado en tumores de parótida y de mama, Polioma replica en las células que conforman los Pilomatrixomas, con un patrón de ensamblaje similar al observado en el humano por el virus Papiloma, es decir, madurando conjuntamente con la queratinización de las células.

550. (3445) APLICACIÓN CLÍNICA DE TERAPIA FOTODINÁMICA CON UN DISPOSITIVO DESARROLLADO EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA. PONS, PATRICIA; BOETTO, NESTOR; PITTAU, ROALD; GARZÓN, RAFAEL; AOKI, AGUSTÍN

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba Departamento de Cirugía Plástica. Hospital Nacional de Clínicas.

La Terapia Fotodinámica (PDT) es un método efectivo, selectivo e ingenioso, además el menos cruento para el tratamiento del cáncer cutáneo. Esta terapia consiste en la aplicación de energía lumínica de una longitud de onda específica (630 nm) para excitar a una droga fotosensible (protoporfirina IX) generando energía capaz de transformar el oxígeno tisular en especies reactivas que destruyen las células neoplásicas. Este método no tuvo difusión en Argentina por falta de fuentes de irradiación de industria nacional y la escasa oferta y alto costo de las fabricadas en el exterior. Objetivo: Nos propusimos desarrollar distintos prototipos para permitir la aplicación de PDT en nuestro país. Mat. y Mét.: Los prototipos desarrollados fueron utilizados en pacientes ambulatorios del Hospital Nacional de Clínicas, con lesiones neoplásicas y preneoplásicas no pigmentadas de piel. Como fotosensibilizador se aplicó en forma tópica un precursor, el ácido delta amino levulinico (ALA), al 20 % y como difusor, ácido taurocólico al 0,2 %. Las lesiones fueron irradiadas cuatro horas después con nuestros prototipos. Los resultados obtenidos en estos cuatro años revelan una alta respuesta positiva (total y parcial) en lesiones superficiales de epitelomas basocelulares (85%) y espinocelulares (100%). El efecto fue levemente menor en los epitelomas basocelulares nodulares (90%) y en epitelomas espinocelulares ulcerados (73%). Los mejores logros se obtuvieron en las queratosis actínicas con un 95% de efectividad en 126 lesiones tratadas. Los excelentes resultados alcanzados con este procedimiento, sirvieron de aliento para proponer el diseño de prototipos más complejos y potentes, que también puedan ser empleados en el diagnóstico, localización, extensión y seguimiento de distintas neoplasias.

551. (3631) ACCIÓN ANTITUMORAL DE ISOFLAVONAS DE LA SOJA EN MODELOS MURINOS DE CÁNCER MAMARIO Y MELANOMA. FARINA, HERNAN; POMIES, MONICA; GOMEZ, DANIEL; ALONSO, DANIEL

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes

El efecto antitumoral de dietas ricas en soja ha sido asociado a la presencia de la isoflavona genisteína (GST). Investigamos los efectos in vitro de GST sobre los mecanismos de la invasión tumoral en células murinas de carcinoma mamario F3II y de melanoma B16. La adhesión de las células de ambas líneas tumorales a sustratos de fibronectina aumentó significativamente (p<0.01) con el pretratamiento con GST (1 a 10 µM). El estudio por zimografía de medios condicionados por monocapas de células F3II tratadas con GST reveló un descenso en las proteasas

tumorales uPA y tPA, mientras que se observó el efecto opuesto en cultivos de B16. La motilidad de las células tumorales en presencia de GST (20 μ M), determinada por el ensayo de "herida" de monocapas confluentes, disminuyó dramáticamente en ambas líneas ($p < 0.001$). In vivo se exploró el efecto de GST sobre la angiogénesis inducida por células tumorales en ratones singénicos. El tratamiento se aplicó durante 5 días y consistió en GST intraperitoneal (15 mg/kg/día) o dieta a base de pellet de soja rico en isoflavonas. El tratamiento con GST y la dieta de soja disminuyeron significativamente la formación de vasos sanguíneos respecto de animales control que sólo recibieron el alimento estándar, tanto en el carcinoma mamario F3II (Control: 1.27 ± 0.14 , GST: 1.00 ± 0.14 , Soja: 0.72 ± 0.14 vasos/mm²; $p < 0.05$) como en el melanoma B16 (Control: 0.60 ± 0.08 , GST: 0.34 ± 0.06 , Soja: 0.29 ± 0.09 vasos/mm²; $p < 0.05$). Los datos confirman la acción de GST sobre mecanismos de la invasión, aportando nueva información acerca de la modulación diferencial de proteasas en variantes tumorales murinas. Además, el consumo de soja reduce la organización vascular de implantes de estos tumores experimentales.

552. (3747) EXPRESION DE HO1 Y SU RELACION CON LA INFLAMACION EN LA PROGRESION AL HUESO DEL CANCER DE PROSTATA. VAZQUEZ, ELBA; *KREIMAN, ERICA; **MEISS, ROBERTO; *NAVONE, NORA

*Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA, CONICET *The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, **Academia Nacional de Medicina*

La activación de la expresión del gen HO1 es una respuesta adaptativa celular al stress oxidativo. La sobre expresión de HO1 está involucrada en la función anti-inflamatoria. Esta proteína estaría, también, relacionado con la neovascularización. Los macrófagos son un elemento clave en la angiogénesis y su presencia está relacionada con la aparición de neoplasias malignas. El daño celular prolongado debido a inflamación crónica es una de las causas del desarrollo de tumores. El objetivo de este trabajo fue investigar la correlación entre inflamación y progresión al hueso del cáncer de próstata. Ratones inmunosuprimidos fueron inyectados con 5 μ l de medio de cultivo conteniendo 1.2×10^6 células de las líneas de adenocarcinomas de próstata humanos, MDA PCa 2b (osteoblástica) o PC3 (osteoclastica) en el femur derecho. Como control se inyectó el mismo volumen de medio en el femur izquierdo. Se estudió la expresión inmunohistoquímica de HO1 y CD 68 (marcador de macrófagos). Los tumores derivados de la línea MDA PCa 2b, presentaron marcación citoplasmática de HO1 en células tumorales e intensa reacción positiva en los osteoblastos activados. En las metástasis óseas derivados de la línea PC3, no se observó expresión de HO1. La expresión de CD68, mostró en tumores derivados de PC3 intensa marcación en células tumorales y también se observó la presencia de macrófagos positivos en la médula ósea. Los tumores derivados de MDA PCa 2b mostraron leve reactividad sin infiltración de macrófagos en la médula ósea. Estos datos sugieren que HO1 estaría involucrada en la reacción osteoblástica provocada por las células del cáncer de próstata en las metástasis óseas y una posible asociación entre inflamación y metástasis ósea en la enfermedad neoplásica.

553. (3751) INDUCCION DE LA EXPRESION DE HO1 COMO RESPUESTA ADAPTATIVA AL DAÑO HEPATICO OXIDATIVO EN LA CARCINOGENESIS. VAZQUEZ, ELBA; CABALLERO, FABIANA; *BINAGHI, MARIA; OLIVERI, LEDA; PENAS STEINHARDT, ALBERTO; BATLLE, ALCIRA; *MEISS, ROBERTO

*Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA, CONICET *Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina*

La hemo oxigenasa (HO) cataliza la degradación del hemo produciendo CO, hierro y biliverdina. La isoforma HO1 juega un rol importante frente al daño oxidativo y el control de la inflama-

ción. Hemos demostrado por inmunohistoquímica (IHQ) que la disminución de la expresión de HO1 se correlacionaba con la progresión de la malignidad en la hepatocarcinogénesis experimental. El objetivo ha sido estudiar si la modulación de la actividad y la expresión de HO se correlaciona con el daño hepático oxidativo. Ratones CF1 recibieron p-dimetilaminoazobenceno (DAB, 0,5% p/p en la dieta) durante 42 días. Los controles (C) se alimentaron con una dieta standard por igual período. Animales de ambos grupos se inyectaron i.p. con hemina (100 mg/kg) o zinc-protoporfirina (ZnPP, 45 μ mol/kg) 24 hs antes del sacrificio. La hemina redujo un 35% el aumento de GSH (nmol/mg tejido: VC= $1,25 \pm 0,14$, VDAB= $2,05 \pm 0,23$) y un 40 % el aumento de TBARS (nmol/mg proteína: VC= $0,135 \pm 0,024$, VDAB= $0,453 \pm 0,103$) mientras que la ZnPP no modificó el estrés oxidativo provocado por el DAB. Por western blot se detectó que la HO1 está sobreexpresada en los animales tratados con hemina (activador de HO) o ZnPP (inhibidor de HO) tanto en los grupos control como en los que recibieron DAB. La detección IHQ de HO1 mostró un aumento de la expresión que fue: a) mayor en el grupo DAB+hemina (con menor daño histológico que en el grupo DAB); b) mayor en el grupo DAB+ZnPP (con mayor daño histológico que en el grupo DAB) pero menor que en el grupo DAB+hemina. La expresión IHQ de HO1 en los grupos tratados fue siempre mayor que en los controles. Estos resultados enfatizan que el camino de la HO1 puede jugar un rol crítico en la adaptación celular a las condiciones de estrés oxidativo desencadenadas en la carcinogénesis.

554. (3797) TERAPIA FOTODINÁMICA DE TUMORES EMPLEANDO DERIVADOS DE ÁCIDO 5-AMINOLEVÚLICO. ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO. DI VENOSA, GABRIELA MARIANA; CASAS, ADRIANA; PEROTTI, CHRISTIAN; BATLLE, ALCIRA; FUKUDA, HAYDEE

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias. CONICET - FCEN (UBA)

Se ha estudiado la eficacia de los derivados de ALA, Hexil-ALA (He-ALA), R,S-ALA-2-(hidroximetil) tetrahidropiraniil-ALA (THP-ALA) y Undecanoil-ALA (U-ALA) en una línea celular tumoral murina, en explantes tumorales y en ratones inoculados con dichas células. In vitro, ALA; He-ALA y THP-ALA forman cantidades máximas similares de porfirinas (40 μ g porf/105 céls). La cinética de síntesis de porfirinas para ALA y sus derivados, sugiere diferentes mecanismos de incorporación a las células. En explantes de tumor, THP-ALA, He-ALA y ALA indujeron también una acumulación de porfirinas similar (5,51 \pm 0,26 μ g porf/g tej). U-ALA sólo produjo un nivel basal de porfirinas. In vivo, la inyección i.p. de los derivados indujo a las 3h en el tumor, una concentración de porfirinas 4 veces menor, comparado con ALA (ALA: 15,9 \pm 1,12 nmol porf/g tej, He-ALA: 3,11 \pm 0,42 nmol porf/g tej). Los niveles de ALA en tumor no se correlacionaron con la síntesis de porfirinas. Los resultados indican que los capilares juegan un rol importante en el ingreso de los ésteres de ALA en las células.

555. (3960) PARTICIPACIÓN DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN NCAM EN MECANISMOS ASOCIADOS A LA DISEMINACIÓN METASTÁSICA EN LA LÍNEA DE TUMOR DE PULMÓN LP07. TODARO, LAURA; URTREGER, ALEJANDRO; SACERDOTE DE LUSTIG, EUGENIA; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA; PURICELLI, LYDIA

Área de Investigación. Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"

Instituto de NCAM se expresa en el sistema nervioso y en varios tumores como cáncer de pulmón a células pequeñas. Estudiamos la participación de NCAM en el comportamiento biológico de la línea LP07, derivada de un tumor de pulmón murino de origen epitelial con componente neuroendócrino. Previamente demostramos que la neutralización de NCAM, que es expresada por las células LP07, reduce significativamente el número y tamaño de las metástasis pulmonares experimentales. Ahora estudiamos in vitro la posible participación de NCAM en las distin-

tas etapas de la cascada metastásica. Se demostró que el tratamiento de células LP07 con el anticuerpo específico anti NCAM disminuyó significativamente su adhesión a plástico (anti NCAM 46%±2 vs control con IgG pre-inmune 74% ± 6, p<0.05) y la migración evaluada a las 12 hs. por el ensayo de wound (anti NCAM 47%±14 vs control IgG pre-inmune 83% ±30, p<0.01). Asimismo, el bloqueo de NCAM indujo la reorganización del citoesqueleto con disminución de las fibras de stress y aumento de la actina cortical. Estas modulaciones del comportamiento celular inducidas por el bloqueo de NCAM no se acompañaron de cambios en la expresión de otras moléculas de adhesión o asociadas al citoesqueleto como son Caderherina E y β Catenina, estudiado por Western Blot (WB). Además, determinamos que el tratamiento con anti NCAM, durante 48 hs. indujo la muerte por apoptosis de las células LP07 (79%±8 vs control IgG pre inmune 34%±4, p<0.05), pero no se asoció con cambios en la expresión de Bcl2 y Bclx, medido por WB. Estos datos sugieren que NCAM participaría en los mecanismos de control de la proliferación tumoral a través de la regulación de la motilidad y la sobrevivencia.

556. (3963) NUEVOS ESTUDIOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO M38 COMPUESTO POR CÉLULAS EPITELIALES LUMINALES (LEP) Y MIOEPITELIALES (MEP). KRASNAPOLSKI, MARTIN; VELOSO, MARÍA JOSE; URTREGER, ALEJANDRO; FISZMAN, GABRIEL; ADAM, ALEJANDRO; DIAMENT, MIRIAM; KLEIN, SLOBODANKA; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA

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

Anteriormente se describió el adenocarcinoma papilífero mamario murino M38 formado por MEP y LEP, metastásico en pulmón y ganglio drenante. Por cultivo se generaron las líneas: LM38-RB (formada por MEP y LEP), LM38-RA (principalmente células epitelioides ahusadas) y LM38-D2 (clon MEP). Para establecer si existe relación jerárquica entre los componentes celulares estudiamos la citogenética de las líneas. En RB, las MEP fueron hipertetraploides y las LEP hipotriploides (62% y 25% de las metafases, respectivamente). En RA el 76% de las células fue hipotriploide y el 18%, hipertetraploide, coincidiendo con el bajo número de MEP en esta línea. El 98% de las D2 fue hipertetraploide. Se encontraron dos marcadores cromosómicos en todos los tipos celulares estudiados y RA presentó además, nuevas alteraciones adquiridas en el cultivo. Dado que in vivo RB se comporta como el tumor parental, y RA y D2 poseen un crecimiento más lento y una disminución o pérdida de la capacidad metastásica estudiamos si la interacción entre estos dos tipos celulares restituía el comportamiento de M38. Para ello diferentes proporciones de células RA y D2, con o sin previo cocultivo de 36 h, fueron coinoculadas s.c. en Balb/C. Si bien no restauraron la histología papilífera ni la diseminación ganglionar, las células cocultivadas mostraron un aumento en la tasa de crecimiento tumoral y en la capacidad metastásica en pulmón (p.e. la inoculación del cocultivo RA:D2 en relación 3:1 indujo un 100% de ratones con metástasis, mediana [Md] 12 y rango (1-48) vs. RA, con 40% de incidencia, Md 0 (0-10)). Los estudios realizados sugieren la existencia de una célula progenitora común a las estirpes LEP y MEP malignas, cuya interacción es necesaria para favorecer el crecimiento tumoral y su diseminación a pulmón.

557. (3992) EFECTO DE DOS AGENTES TERAPÉUTICOS SOBRE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PACLITAXEL IN VITRO. ZERDIEW, ANA^{1, 2}; RIVA, DIEGO¹; BAGNES, CLAUDIA²; MERSICH, SUSANA¹

¹Depto de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA ²Oncología. Hospital Tornú. GCBA

Dentro de los compuestos con acción antineoplásica, el paclitaxel (P), desestabilizante de los microtúbulos, cuyo mecanismo de acción está aún en estudio, induce apoptosis por distintos caminos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la interacción de P con otros fármacos, como el ácido acetil salicílico

(A) y un compuesto antioxidante y polivitamínico (V), en una línea celular de adenocarcinoma humano, A549. Para ello se incubaron simultáneamente P+A y P+V durante 24-48 hs, a 37 °C. La evaluación de la supervivencia celular se realizó por a) una tinción con cristal violeta (CV), y b) una tinción con Ioduro de Propidio, para medir apoptosis por citometría de flujo (FACS). El estudio de la citotoxicidad para cada uno de los compuestos por separado, mostró que la concentración de P 3,75ug/ml afectó en un 50% a la supervivencia celular, A 10mM fue una dosis no citotóxica, y V mostró un efecto de proliferación celular, con un máximo en 1,38ug/ml. En la incubación de P+A ó P+V no se observaron diferencias significativas por CV (A 10mM y V 0,97ug/ml). Sin embargo el resultado para P+V (V 2,7ug/ml) fue de proliferación. La medida por FACS reveló en cambio, que mientras A no afecta la apoptosis inducida por P, V (0,69 ug/ml) incrementa la apoptosis por P, en un valor relativo de 30%, con respecto al valor individual. Por lo tanto, el efecto proliferativo observado en la interacción de P con V, ocurre sólo a una alta concentración de V y el sinergismo para el efecto apoptótico, de la combinación de P+V, observado por FACS, tiene lugar a una menor concentración de V. Estos resultados sugieren que la actividad biológica de V dependería de la dosis usada.

558. (4046) MODULACIÓN DE LOS MASTOCITOS SOBRE PARÁMETROS IN VITRO DE LA PROGRESIÓN TUMORAL DE UN ADENOCARCINOMA DE PULMÓN MURINO. MALAMENT, ELIZABETH; GLEISER, MARCELA; PURICELLI, LYDIA; LAURIA DE CIDRE, LILIA

Lab. de Histología Animal FCEyN UBA, Area de Investigación Instituto de Oncología "AH Roffo".UBA

Existe una elevada proliferación de mastocitos (MC) en los tejidos conectivos peritumorales, sin haber unanimidad de criterios respecto de su rol funcional. Objetivo: Estudiar la influencia de los MC o de sus medios condicionados (MCoMC) sobre parámetros in vitro de la progresión tumoral en la línea LP07 derivada de un tumor de pulmón espontáneo en BALB/c. Evaluamos la proliferación de las células tumorales (CT) en presencia de MC o de MCoMC en proporción 1MC:10CT por recuento celular. Se observó una disminución significativa de la proliferación a las 24hs de cultivo tanto con el agregado de MC (72.0±8.6%) como con el agregado de MCoMC (82.7±12.8%). La acción del MCoMC en la adhesión de las CT a fibronectina (FN) a 60', mostró un incremento en la adhesión de 80±14 CT/mm2 respecto del control (40±2 CT/mm2). La influencia del MCoMC sobre la capacidad migratoria e invasiva de las CT se evaluó en cámaras transwell con el agregado de Matrigel en el segundo caso. Se obtuvo una disminución significativa tanto en la migración (140±7 vs 231±7 CT/10mm2) como en la invasión (13±2 vs 73±5 CT/10mm2). La actividad de metaloproteasas analizada por zimografía no se vio modificada por MC ni MCoMC, mientras que el MCoMC aumentó en un 250.0±68.4% la producción de uPA, evaluado por caseinólisis radial. Todos los datos presentados fueron significativos con un p<0.05. Podemos concluir que tanto los MC como sus MCoMC tienen la capacidad de modificar parámetros importantes de la progresión en nuestro modelo tumoral. La expresión de enzimas involucradas en la invasión varía según se module el sistema con MC en cocultivo con las CT o con MCoMC, lo que destaca la importancia de la interacción directa de los MC con las CT.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES IV

559. (3395) REGULACIÓN MOLECULAR DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE BMP-4/ TGF- β EN CÉLULAS HIPOFISARIAS. GIACOMINI, DAMIANA*; CARBIA NAGASHIMA, ALBERTO*; ARZT, EDUARDO*

*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular *Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, ^CONICET*

Previamente reportamos el rol de BMP-4 en la tumorigénesis de prolactinomas y la existencia de un crosstalk funcional entre

BMP-4 y E2. Estudios in vivo sugirieron que la vía estimuladora de BMP-4 predomina sobre la inhibitoria de TGF- β . En este trabajo demostramos que la coestimulación BMP-4/TGF- β induce la proliferación celular (WST-1) de la línea tumoral lactosomatotrofa GH3, predominando así BMP-4. La existencia de diferentes complejos Smad/ER explicaría estos efectos opuestos. Mediante coimmunoprecipitaciones detectamos una interacción física Smad1-ER al estimular con BMP-4 y/o E2 y Smad2-ER en presencia de TGF- β y/o E2. Estos complejos tienen una actividad transcripcional diferencial: en transfecciones transientes tanto BMP-4 como TGF- β inhiben la actividad transcripcional ER (ERE-LUC), sin embargo sobre el promotor de prolactina (dependiente de la activación ER) BMP-4 estimula y TGF- β inhibe la regulación transcripcional. Un antagonista de la familia Smad, Tob, se expresa (Northern Blot) en hipófisis normal y en GH3. BMP-4 y TGF- β aumentan la expresión de Tob, pero los E2 no poseen efecto. Tob por su parte inhibe la actividad transcripcional de BMP-4. A su vez el factor de transcripción COUP-TFI (importante en la patogénesis corticotrofa) inhibe la actividad del promotor de BMP-4 en GH3 mientras que en la línea corticotrofa AtT20, donde BMP-4 inhibe la proliferación en lugar de inducirla, COUP-TFI induce al promotor de BMP-4, demostrando una regulación diferencial del promotor de BMP-4 en correlación inversa con la proliferación. Concluimos que la regulación fina de la expresión de BMP-4, su antagonista Tob y los complejos Smads/ER, son fundamentales para determinar la acción negativa o positiva de BMP-4 y/o TGF- β sobre la proliferación celular hipofisaria.

560. (441) VÍAS MENSAJERAS INVOLUCRADAS EN LA SEÑAL DE LA PROGESTERONA EN TEJIDO VASCULAR.
MENDIBERRI, JOSEFINA; SELLÉS, JUANA;
MASSHEIMER, VIRGINIA

Cátedra Análisis II - Universidad Nacional del Sur Cátedra de Análisis Clínicos II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. U.N.S.

Previamente demostramos que en tejido aórtico de rata, la Progesterona (Pg) en forma no genómica, estimula la producción de NO y como consecuencia se activa la COX (ciclooxigenasa). En este trabajo investigamos las vías de señalización involucradas en el mecanismo de acción hormonal. Para ello empleamos anillos de aorta aislados de ratas hembras en edad fértil, tratados "in vitro" con 10 nM Pg por 1 a 10 min. Observamos que Pg incrementa significativamente la síntesis de prostaciclina (PGI₂), exhibiendo un perfil temporal bifásico con máximos aumentos a los 45 segundos y a los 5 minutos (150% y 105 % sobre el control respectivamente, $P < 0.01$). Por el contrario no se detectaron diferencias en la producción de tromboxanos y prostaglandinas D₂ y E₂, lo cual sugiere una acción diferencial de la hormona sobre las enzimas que amplifican la señal de COX: PGI₂ sintasa, Txasa y PGasa. Se obtuvo evidencia que el sistema tirosin quinasa participa en la acción de la hormona. El incremento en PGI₂ inducido por Pg, fue suprimido por Genisteína 30 μ M (inhibidor deTK). Se estudió el efecto del tratamiento hormonal sobre el sistema PLC/DAG/PKC. Usando 3H-araquidonato como precursor se cuantificó la producción de DAG por TLC. La Pg estimula débilmente la síntesis de DAG, pero dicho efecto se ve marcadamente potenciado en presencia de Genisteína ($P < 0.01$), sugiriendo la existencia de un "cross talk" entre las vías TK y PLC. Se determinó que la estimulación de la síntesis de NO inducida por Pg, no se altera en presencia de chelerytrine 1 μ M (inhibidor de PKC). En conclusión los resultados descriptos aportan evidencias que Pg regula el metabolismo vascular a través de un mecanismo que comprende la activación de la NOS y PGI₂ sintasa e involucra la participación del sistema TK y PLC/PKC.

561. (3457) LA INHIBICIÓN DE CALMODULINA KINASA RESTABLECE LA ACTIVIDAD DE ÓXIDO NITRICO SINTASA Y LA SEÑALIZACIÓN POR ÓXIDO NITRICO EN GLÁNDULAS SUBMAXILARES DE RATONES NOD.

ROSIGNOLI, FLORENCIA; ROCA, VALERIA; MEISS, ROBERTO; PEREZ LEIROS, CLAUDIA

Departamento de Química Biológica, facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Academia Nacional de Medicina

Los ratones NOD desarrollan una disfunción secretoria salival comparable al síndrome de Sjögren en humanos. El óxido nítrico actúa como mediador inflamatorio y mensajero intracelular de neurotransmisores que aumentan el flujo salival. Previamente informamos una menor actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) en glándulas salivales de ratones NOD que no estaba asociada a menor expresión de mRNA ni proteína o a una diferente localización de isoformas de la enzima. Con el objeto de investigar si este efecto era consecuencia de una regulación post-traducciona por proteínas quinasas, medimos la actividad de NOS en presencia de inhibidores de PKC y calcio-Calmodulina quinasa II (CaMK II) en glándulas submaxilares de ratones NOD y controles BALB/c. La actividad de NOS se midió con L-[U-¹⁴C]-arginina como sustrato (arginina 0,15-10 μ M) y en presencia de bisindolilmaleimida I o KN-93, inhibidores de dichas proteínas quinasas. La acumulación de GMPc se determinó por RIA. El inhibidor de PKC no modificó la actividad basal ni la estimulada por péptido intestinal vasoactivo (VIP) 10-7M. El KN-93, en cambio, aumentó la actividad de NOS en glándulas de ratones controles y NOD, restituyendo la actividad específica de NOS en estos últimos con parámetros cinéticos similares a los de BALB/c (Km (μ M) BALB/c: 5,8 \pm 1,7; NOD: 48,8 \pm 39,3; NOD + KN-93: 9,8 \pm 1,7; Vmax (pmol/mg) BALB/c: 8,4 \pm 1,2; NOD: 33,7 \pm 23,3; NOD + KN-93: 9,4 \pm 1,0). La inhibición de CaMK II también restableció la acumulación de GMPc en ratones NOD y ese efecto fue bloqueable por un inhibidor de NOS, confirmando la participación de óxido nítrico. Los resultados indican que hay una regulación negativa de la NOS por CaMK II pero no por PKC en glándulas submaxilares de ratones normales y NOD. Dicha regulación participa en la falta de actividad de la NOS y la menor acumulación de GMPc por la vía de óxido nítrico descriptas previamente en glándulas salivales de ratones NOD.

562. (3476) P19INK4D TRANSLOCA AL NÚCLEO Y DISMINUYE LA APOPTOSIS LUEGO DE LA IRRADIACIÓN CON UV EN CÉLULAS NEURONALES. CERUTI, JULIETA; SCASSA, MARÍA; SIRKIN, PABLO; CÁNEPA, EDUARDO

Departamento de Química Biológica-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la sobreexpresión de p19INK4d, un miembro de la familia INK4 de inhibidores de CDK4/6, aumenta la reparación de un DNA dañado con UV sugiriendo su posible vinculación con el mantenimiento de la integridad del genoma. El objetivo del trabajo consiste en determinar la localización subcelular de p19, su posible modificación luego de la acción de agentes genotóxicos y su mecanismo de acción. Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en células de neuroblastoma humano luego de ser irradiadas o no con 20 mJ/cm² de UVC, utilizando anti-p19 y antiIg-FITC. p19 se detecta en el 43% de las células control siendo en el 93% de ellas citoplasmática. Por el contrario, 24h post-UV el porcentaje de células con p19 aumenta observándose una translocación nuclear a partir de 36h con un máximo a las 48h (75% con p19 y de ellas un 60% nuclear). A las 72h hay una disminución en el total de células con p19 (55%) y una reversión hacia el citoplasma (90%). Se estudió el efecto de p19 sobre la apoptosis determinando la actividad de caspasa-3 en células con la expresión de p19 aumentada o disminuida e irradiadas con UV. La actividad enzimática aumentó en células irradiadas (275%) y fue mayor en células con expresión inhibida de p19 (305%), mientras en células con sobreexpresión de p19 apenas superó el nivel basal (120%). La sobreexpresión de mutantes CDK4, deficientes en actividad quinasa o en su unión a INK4, no modifican el efecto antiapoptótico de p19. Estos resultados sugieren que, el estímulo de un agente genotóxico y/o la detección del daño genómico, inducen la expresión de p19INK4d y su translocación nuclear promoviendo una mayor reparación del DNA

y disminuyendo la apoptosis. El efecto de p19 sería independiente de su interacción con CDK4/6.

563. (3558) EFECTO DE ACTH SOBRE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE L-ARGININA EN CELULAS ADRENALES: SU INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD DE OXIDO NITRICO SINTASA (NOS). PANNUNZIO, VANESA; GADDA, LUCIANA; POMERANIEC, YAEL; CYMERYNG, CORA

Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA

En trabajos previos estudiamos el transporte de L-arginina, sustrato de la actividad de NOS, en células adrenales. El objetivo de éste trabajo fue analizar los sistemas de transporte y estudiar el efecto de la estimulación con ACTH sobre su actividad y sobre la producción de NO. En condiciones basales, el transporte de [³H]L-arginina exhibió las siguientes características: 1) fue inhibido por L-arginina, L-lisina y L-ornitina y no por D-arginina. 2) no fue afectado por aminoácidos neutros como L-leucina o L-valina 3) fue independiente de Na⁺, 4) se observó transestimulación en presencia de L-lisina y 5) fue inhibido significativamente por N-etilmaleimida. En estas condiciones se determinó la expresión de los transportadores CAT-1 y de ambas isoformas de CAT-2 por RT-PCR. El transporte de L-arginina se incrementó significativamente en función del tiempo de incubación en ausencia de suero y en presencia de ACTH (en pmol/min/mg C: 142.9 ± 15.3 Cs/suero 348.9 ± 20.8, ACTH 548.5 ± 7.5 n= 6). El efecto de ACTH fue bloqueado por cicloheximida y por actinomicina D. El incremento en el transporte de L-arginina correlacionó con un aumento en la producción de nitritos, índice de la actividad de NOS. El efecto de ACTH fue reproducido por 8Br-cAMP. El transporte de [³H]L-arginina en células estimuladas con ACTH se inhibió significativamente por L-leucina en forma dependiente de Na⁺. El análisis por RT-PCR reveló la expresión de los transportadores de la familia CAT y de CD98 e y+LAT2. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad de NOS depende de la disponibilidad de L-arginina que es regulada por su sistema de transporte a través de la membrana plasmática. En condiciones basales el transporte es mediado por el sistema y+ mientras que en presencia de ACTH se induce el sistema y+L que transporta asimismo aminoácidos neutros.

564. (3617) ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB EN CÉLULAS DE SERTOLI DE RATA DE 20 DÍAS DE EDAD EN CULTIVO POR FSH, FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO (FGF) E INTERLEUKINA 1BETA (IL1BETA). GALARDO, MARIA NOEL LUJAN; RIERA, MARIA FERNANDA; MERONI, SILVINA BEATRIZ; PELLIZZARI, ELIANA HERMINIA; CIGORRAGA, SELVA BEATRIZ

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños R. Gutiérrez

Demostramos previamente que FSH, FGF e IL1beta estimulan la producción de transferrina (TRF) y la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en células de Sertoli en cultivo (CS). Los genes que codifican para estas proteínas presentan un sitio CRE-like en su promotor por lo que puede presuponerse que la activación de CREB en respuesta a FSH, hormona que utiliza una vía clásica AMPc/pkA, podría estar involucrada en la respuesta biológica observada. No se ha analizado aún la posibilidad que FGF e IL1beta activen CREB en CS. El objetivo de este trabajo fue determinar si existe activación de CREB en respuesta a FGF y a IL1beta en CS y asimismo analizar los posibles sistemas de transducción de señales que podrían participar en dicho estímulo. Cultivos de CS fueron estimulados con FSH (100ng/ml), FGF (30ng/ml) e IL1beta (50ng/ml) por 5 y 15 minutos. Se analizó por Western blot la fosforilación de CREB (P-CREB). Se observaron aumentos en P-CREB que fueron máximos a los 15 min con FSH (10.7±4.3) y con IL1beta (6.4±1.9) y a los 5 min con FGF (6.9±2).

Los resultados se expresan como veces de estímulo con respecto al basal, media±DS, de tres experimentos independientes. El aumento de P-CREB por FGF se inhibió cuando la estimulación se realizó en presencia de los inhibidores de MEK, PD98059 (10 microM) y U0126 (1 microM), mientras que el aumento de P-CREB por IL1beta disminuyó en presencia de un inhibidor de p38MAPK, SB203580 (2 microM). Los resultados obtenidos demuestran que en CS, además de la vía clásica AMPc/pkA utilizada por FSH, tanto la vía dependiente de MAPK estimulada por FGF así como la vía dependiente de p38MAPK estimulada por IL1beta son capaces de producir activación de CREB.

565. (3806) EFECTO DEL NITROXILO SOBRE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA NITRERGICO EN LA RETINA DEL HAMSTER DORADO. SAENZ, DANIEL; BARI, SARA; DOCTOROVICH, FABIO; ESTRIN, DARIÓ; ROSENSTEIN, RUTH

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, FCEyN, U.B.A

En trabajos previos hemos caracterizado el sistema nitrérgico en la retina del hámster dorado. Evidencias recientes sugieren que el nitroxilo (HNO), la forma reducida de óxido nítrico (NO) podría ser un producto primario de la reacción catalizada por las óxido nítrico sintasas (NOS). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar comparativamente el efecto de HNO y NO sobre el sistema nitrérgico retiniano. Para ello, se analizó el efecto de un donador de nitroxilo (Sal de Angeli, SA) y de un liberador de NO, nitroprusiato de sodio (SNP) sobre los siguientes parámetros: influjo de L-arginina (utilizando 3H-arginina), actividad de NOS (a través de la conversión de 3H-arginina a 3H-citrulina) y niveles de GMPc (por RIA). Asimismo, como índice de daño oxidativo se determinó la peroxidación lipídica retiniana (analizando niveles de TBARS por espectrofluorometría). La SA pero no el SNP disminuyó significativamente el influjo de L-arginina (control: 5.3 ± 1.2, SA: 2.5 ± 0.4, SNP: 6.1 ± 0.4 nmol/mg prot min). Tanto la SA como el SNP inhibieron significativamente la actividad de NOS (control: 3.9 ± 0.5, SA: 2.8 ± 0.3, SNP: 1.9 ± 0.3 pmol/mg prot. 30min). Ambos compuestos aumentaron los niveles de GMPc (control: 53 ± 3, SA: 93 ± 8, SNP: 108 ± 8 pmol /mg prot. 30min). Sólo el SNP indujo un aumento de la peroxidación lipídica retiniana (control: 0.8 ± 0.2, SA: 0.7 ± 0.1, SNP: 1.1 ± 0.3 nmol TBARS /mg prot.) Estos resultados indican que el HNO y el NO podrían regular negativamente su propia síntesis, probablemente actuando a través de mecanismos de acción diferentes. Asimismo, dado que el GMPc es una de las moléculas clave en el mecanismo de fototransducción, estos resultados indican que el nitroxilo podría participar en el procesado de la información fótica.

566. (3890) LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA HSP90 ES REGULADA DURANTE EL DESARROLLO DE TOXOPLASMA GONDII. ECHEVERRIA, PABLO; MATRAJT, MARIANA; ZAPPIA, MARÍA PAULA; DUBREMETZ, JEAN FRANÇOIS; ANGEL, SERGIO OSCAR

INTECH ANLIS Carlos G. Malbrán, Pennsylvania University, Université de Montpellier II

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que produce infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos. La diferenciación in vivo al estadio bradizoito (baja replicación) es una respuesta relacionada con estrés del parásito en respuesta a condiciones ambientales tales como la respuesta inflamatoria del huésped al estadio taquizoito (altamente replicativo). La inducción del desarrollo del estadio bradizoito in vitro se asocia con la temperatura, el pH y otros tipos de estresores. Todos estos estímulos son conocidos también como inductores de la expresión de proteínas de choque térmico (Hsps). Asimismo fue observado que las Hsps no son solamente esenciales durante la respuesta al estrés sino que también son regu-

ladas durante el desarrollo. Nuestros estudios se focalizaron en el perfil de expresión de la Hsp90 de *T. gondii* en dos cepas del parásito, ambas útiles para estudios de diferenciación de estadio in vitro. Mediante ensayos de RT-PCR se observó una sobreexpresión del gen hsp90 durante la conversión taquizoito a bradizoito. Este aumento en la expresión de la hsp90 fue también observada a nivel de proteína mediante ensayos de Western blot. Por otro lado, mediante análisis de microscopía confocal se observó una localización intracelular diferencial de la proteína en los diferentes estadios: mientras que en el estadio taquizoito la proteína se encuentra en el citoplasma y excluida del núcleo, en el estadio bradizoito la proteína se encuentra en el citoplasma y también en el núcleo del parásito. Observamos un aumento en la producción de la Hsp90 bajo condiciones in vitro que inducían al parásito a un cambio de estadio. También se observó una traslocación de la hsp90 al núcleo durante la conversión a bradizoito. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión y localización nuclear de la proteína Hsp90 pueden ser importantes para el establecimiento y/o mantenimiento de una señal/señales que habiliten el cambio de estadio en *T. gondii*.

567. (3976) DOSIS MÍNIMAS DE HEXACLOROBENCENO INDUCEN UN AUMENTO EN LA CANTIDAD DE C-SRC ASOCIADA AL EGFR Y ACTIVA SU PTK INTRÍNSECA EN HÍGADO DE RATA. CARDOZO, JULIAN; KLEIMAN, DIANA; MORON, MARIO; KOLLIKER FRERS, RODOLFO; RANDI, ANDREA

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

El Hexaclorobenceno (HCB) es un tóxico ambiental inductor de porfiria y promotor de tumores hepáticos. Se une al Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (AhR) citosólico, asociado a la proteína tirosina kinasa (PTK) c-Src. Se propuso que esta última se liberaría al unirse el tóxico y se asociaría a receptores de factores de crecimiento, como el EGFR, pudiendo fosforilarlos y así activarlos. Nos propusimos estudiar los efectos del HCB sobre la translocación de c-Src de citosol a membrana y la activación del EGFR. Realizamos una curva de dosis de HCB en ratas hembras Wistar (0, 0.1, 1 y 10 mg /100 g p.c.) durante 30 días; y una curva de tiempo a dosis HCB 0.1 mg/100g p.c. (0, 12 y 24 h, 10 y 30 días). Mediante inmunoprecipitación estudiamos: 1- los niveles de c-Src citosólicos y microsomaes y de EGFR microsomaes por inmunoblot y 2- sus actividades PTK por incorporación de ³²P a enolasa como sustrato. Demostramos que el HCB: aumentaba los niveles de EGFR 130% (p<0,05) desde 0.1 mg/100 g y su actividad PTK 200% (p<0,05) desde 10 mg/100 g; aumentaba las cantidades de c-Src microsomal 18% y su actividad PTK 100% desde 0.1 mg/100 g y a partir de las 12 h, mientras disminuía en cantidad en citosol 43%. Los niveles de EGFR superaron al control a las 24 hs 20% (p<0.0001) y la cantidad de c-Src que coimmunoprecipitó con el EGFR aumentó desde las 24 horas 100% (p<0.0001). Los resultados sugieren que el tratamiento con HCB aumentaría la translocación del c-Src del citosol a la membrana. Dosis mínimas de HCB aumentaron los niveles de c-Src y su actividad PTK intrínseca asociada al EGFR, resultando en un incremento de la cantidad de EGFR y de su actividad PTK. Estos hallazgos son relevantes en el estudio de los eventos moleculares tempranos del HCB como promotor tumoral hepático.

568. (4022) MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA MOTILIDAD DE CÉLULAS TUMORALES POR TGF-β. DAROQUI, M. CECILIA; PURICELLI, LYDIA; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA; * BAKIN, ANDREI V.

*Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Area Investigacion
* Cancer Genetics Department, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA*

La familia de factores de crecimiento transformante tipo beta, TGF-β, está implicada en la regulación de los principales procesos biológicos celulares, así como en la progresión tumoral. Previamente determinamos que las células de adenocarcinoma

mamario murino LM3, altamente invasivas y metastásicas, secretan TGF-β y además responden a la citoquina con un aumento en la metaloproteínasa MMP-9, en la migración y la invasión. Estudiamos los mecanismos de migración e invasión celulares, dos importantes contribuyentes del fenotipo metastásico, en respuesta a TGF-β. Por medio de vectores retrovirales marcados con EGFP se generaron células LM3 que expresan mutantes dominantes negativos (dn) de los receptores de señalización de TGF-β, TβRI y TβRII. Mediante el ensayo de invasión in vitro por cámaras Transwell cubiertas con Matrigel, determinamos que la expresión de receptores mutados inhibe la capacidad invasiva celular, independientemente de TGF-β (pej: 158±30 y 293±50, en células control sin tratar y tratadas con TGF-β1, respectivamente, vs 22±8 y 32±12 al expresar dnTβRI). Resultados similares se obtuvieron con el ensayo de wound. Conociendo que TGF-β activa las vías p38Mapk y Erk en las células LM3, se estudiaron estos efectos utilizando inhibidores de quinasas específicos. Se encontró que tanto el inhibidor de p38Mapk, SB202190, como U0126, inhibidor de MEK/Erk, bloquearon completamente el aumento por TGF-β de la capacidad migratoria e invasiva de LM3. BB-94, un inhibidor de MMPs, también bloqueó el incremento en la invasión. Podemos concluir que cualquiera de los receptores de señalización es esencial para la regulación de la migración e invasión por TGF-β y que estas respuestas involucran las vías p38Mapk, MEK/Erk así como la inducción de la secreción de MMPs.

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ORAL

CARDIOLOGIA IV

569. (3521) LA INHIBICIÓN DE LA ANGIOTENSINAI EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO CARDIOVASCULAR DE RATA NORMAL. BASSO, NIDIA; STELLA, INÉS; PAGLIA, NORA; FERDER, LEÓN; INSERRA, FELIPE

Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular. UBA Instituto de Investigaciones Cardiológicas. Facultad de Medicina, UBA. CONICET.

La inhibición crónica de Angiotensina II (AngII) con Enalapril (E) o Losartan (L) al destete o a la mitad de la vida protege de cambios cardiovasculares en rata añosa normal. Analizamos cambios a 18 meses de edad en ambos casos comparando capacidad de protección y reversión del daño en tratamiento tardío vs grupo Control (C). Ratas Wistar macho (n=87) se dividieron: C1(n=18); C2(n=10); E1(n=14); E2(n=14); L1(n=9); L2(n=14). Los 1 se tomaron al destete y los 2 a 12 meses. Se estudió un C3(n=8) de 12 meses. Los E tomaron 10 mg/kg/día y los L 30 mg/kg/día hasta 18 meses, cuando se realizó el estudio histológico. Corazón (Cz), ventrículo izquierdo (VI) y aorta (Ao) se pesaron (P), fijaron en formol 10% y se tiñeron con H&E y tricrómico de Masson. Se inmunomarcó con anticuerpos monoclonales de alfa-SM-actina (a-Act) y colágeno III (CIII): fibrosis cardíaca (FC) se evaluó con tricrómico, a-Act y CIII. El score de lesión: 0=normal; 1=leve; 2=moderada; 3=severa. Resultados: Media±SEM. *p<0.05 vs C correspondiente (ANOVA).

	PCz (g)	PVI (g)	PAo (mg)	FC	a-Act	CIII
C1	1.86±0.06	1.37±0.04	209.4±7.6	2.29±0.16	0.65±0.20	1.77±0.16
L1	1.41*±0.13	1.13*±0.06	174.0*±7.0	1.33*±0.28	0.25±0.11	0.67*±0.38
E1	1.48*±0.03	1.04*±0.03	174.6*±7.9	0.75*±0.17	0.25±0.11	0.25*±0.17
C3	1.68±0.05	1.24±0.03	170.3±6.1	1.56±0.15	0.25±0.09	0.81*±0.21
C2	1.80±0.08	1.39±0.05	201.5±7.2	2.14±0.21	0.43±0.17	1.83±0.10
L2	1.44*±0.05	1.12*±0.05	152.4*±9.8	1.09*±0.22	0.14±0.10	0.86*±0.15
E2	1.41*±0.07	1.07*±0.06	165.2*±4.1	1.20*±0.15	0.15±0.11	0.95*±0.14

La inhibición crónica de AngII previene la hipertrofia y fibrosis miocárdica del envejecimiento en la rata normal. El tratamiento iniciado en la mitad de la vida evita pero no revierte dichos cambios.

570. (3559) COMPARACIÓN DE DIFERENTES TIEMPOS DE ADMINISTRACIÓN DE LOSARTAN SOBRE EL REMODELAMIENTO VENTRICULAR POST-INFARTO DE MIOCARDIO EN CONEJOS. MONROY, SILVINA; GONZÁLEZ, GERMÁN; PALLEIRO, JIMENA; DEPETRIS CHAUVÍN, ANA; ARAGÓN, MARTÍN; GELPI, RICARDO J.; MORALES, CELINA

Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Dto de Patología, Facultad de Medicina, UBA.

Trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que la administración temprana de losartán (L) luego del infarto de miocardio (IM) tiene un efecto desfavorable sobre el remodelamiento ventricular (RV). Sin embargo, no fue comparado con el efecto producido por la administración tardía de L. Objetivo: Estudiar el efecto de la administración temprana (inicio del IM) y tardío (15 días post-IM) del L sobre el RVpost-IM. Métodos: 31 conejos fueron sometidos a ligadura de la arteria coronaria izquierda. Se realizaron 4 grupos experimentales: G1(sham; n=9), G2 (IM; n=8), G3 (IM+L; n= 9), y G4 (IM+L; n=5). En G3 el L (12.5 mg/kg/d) se administró desde las 3 hs. y, en G4, desde los 15 días postcirugía. A los 35 días, los animales fueron sacrificados, se aisló el corazón y se lo perfundió según la técnica de Langendorff para construir curvas presión-volumen. Resultados: (X±SEM) El tamaño de IM fue para G2=25.38±5.31, G3=21.85±4.13 y G4=23.38±5.31. VD: volumen diastólico a PDF:10 mmHg. *p<0.05 vs G1 y G3.

	G1	G2	G3	G4
VD (ml)	0.16±0.03	0.36±0.07*	0.69±0.11	0.34±0.08*

La administración de L atenuó la dilatación ventricular cuando se administró tardíamente. Estos datos sugieren que el tiempo de administración de L es importante en la evolución del RVpost-IM.

571. (3700) ALTERACIÓN EN LA DINÁMICA CAÓTICA DE LA REGULACIÓN AUTONÓMICA DEL RITMO SINUSAL EN ADULTOS MAYORES CON SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS Y DEPRESIÓN ASOCIADA. VIGO, DANIEL E.; NICOLA SIRI, LEONARDO; LADRÓN DE GUEVARA, M. SOLEDAD; MARTÍNEZ MARTÍNEZ, JOSÉ A.; FAHRER, RODOLFO D.; CARDINALI, DANIEL P.; MASOLI, OSVALDO; GUINJOAN, SALVADOR M.

Lab. Neurociencias - Depto. de Fisiología - Facultad de Medicina - UBA Depto. Salud Mental y UCO, Hosp. de Clínicas "J. de San Martín" (UBA); Fac. de Bioingeniería (UNER).

Antecedentes: La depresión es común en adultos mayores y se relaciona con un peor pronóstico en los síndromes coronarios agudos. La base de esta asociación no se ha determinado. El análisis de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca (VFC) por medio de indicadores de Dinámica Caótica permite evaluar los fenómenos no lineales de la regulación autonómica del ritmo sinusal. Se ha demostrado que alteraciones en estos indicadores predicen mortalidad en pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) reciente. Objetivo: Determinar si los pacientes con enfermedad coronaria aguda y depresión asociada muestran cambios en la dinámica caótica de la VFC. Material y método: Se analizaron 52 pacientes mayores de 60 años dentro de las 72 hs de haber sido admitidos a la unidad coronaria con diagnóstico de IAM o angina inestable. La duración de cada intervalo RR fue registrada a lo largo de 10 minutos, calculándose indicadores no lineales que incluyeron el "desvío estándar de la variabilidad latido a latido" (SD1), el "exponente de correlación fractal alpha 1" (A1) y la "entropía aproximada" (ApEn). Se evaluó la presencia de depresión según los criterios del DSM-IV y se cuantificó su severidad mediante la escala de Hamilton. Resultados: Se encontró la presencia de depresión en 19 pacientes (37%). A1 fue mayor

(1.23 ± 0.21 vs. 1.03 ± 0.30, p < 0.05) mientras que SD1 (10.4 ± 3.7 vs. 14.4 ± 7.3, p < 0.05) y ApEn (0.98 ± 0.22 vs. 1.16 ± 0.15, p < 0.001) fueron menores en los pacientes deprimidos. Por otro lado, A1 aumentó (r = 0.31, p < 0.05), y SD1 (r = -0.46, p < 0.01) y ApEn (r = -0.28, p < 0.05) disminuyeron con el agravamiento de los síntomas depresivos. La presencia de depresión se asoció con una mayor correlación fractal y una menor complejidad no lineal de la regulación autonómica del ritmo sinusal en adultos mayores con síndromes coronarios agudos.

572. (4012) HIPERTROFIA DE MIOCARDIO EN MODELOS COMBINADOS DE SOBRECARGA DE PRESIÓN Y DE VOLUMEN: PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y ALTERACIONES MORFOMÉTRICAS. CAVALLERO, SUSANA; GONZÁLEZ, GERMÁN; PUYÓ, ANA M; MORALES, CELINA; ROSÓN, MARÍA I; PÉREZ, SUSANA; HERTIG, CECILIA M; GELPI, RICARDO; FERNÁNDEZ, BELISARIO

Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Depto. de Patología. Fac. de Medicina. UBA. Cát. de Biol.Cel. Fac.Farm.y Bioquímica. INGEBI-CONICET

Se conoce el comportamiento de los péptidos natriuréticos en la hipertrofia de miocardio por sobrecarga de presión (SP) o sobrecarga de volumen (SV) pero no en modelos combinados sucesivamente (como en la evolución de la hipertensión arterial). Se utilizaron ratas Sprague Dawley con SV (DOCA-sal+uninefrectomía) y SP (1riñón-1clip) durante 2 y 4 semanas y combinados SV2sem/SP2 sem y SP2sem/SV2sem, con sus grupos sham (Sh). Se determinó presión sistólica indirecta (PS), factor natriurético atrial (ANF) plasmático por RIA y se evaluaron cambios histomorfométricos en corazón. La PS se elevó en todos los grupos a las 2 sem (mmHg±ES, n=12-15, Sh: 111±3; SV: 134±3; SP: 149±2; p<0,001 vs. Sh) y a las 4 sem (n=10-15, Sh: 114±3; SV: 158±2; SP: 161±7; SV/SP: 164±5; SP/SV:150±2; p<0,001 vs. Sh) y el diámetro transversal de los miocitos se incrementó 12% en SV y 11% en SP a las 4 semanas (n=7-9, p<0,05). La concentración de colágeno disminuyó 46 % en SV/SP (n=6, p<0,05). El ANF aumentó en los grupos hipertensos a las 2 sem (pg/ml±ES, n=8-11, Sh: 72±15; SV: 172±14; SP: 170±29; p<0,05 vs. Sh)) y a las 4 sem (n= 10-14, Sh: 102±13; SV: 249±26; SP: 288±41; SV/SP: 657±82; SP/SV: 269±29; p<0,05 vs. Sh; *p<0,001 vs. SP, SV y SP/SV). Conclusión: Los cambios en el ANF precedieron a las alteraciones morfométricas que acompañan el remodelado ventricular. El aumento de la PS a 2 y 4 sem no se correlacionó con el ANF por lo que ambos procesos que acompañan la hipertrofia no son interdependientes. El corazón endócrino responde igual a SV y SP a las 2 sem pero a las 4 sem el ANF aumenta más en SV/SP. El paso de SV a SP produce un perfil hormonal acorde con el remodelado más desfavorable, asociado con una menor concentración de colágeno que favorecería la dilatación ventricular.

GENÉTICA Y PROLIFERACIÓN CELULAR III

573. (3406) CROMOSOMA 15 MARCADOR SUPERNUMERARIO EN UN PACIENTE CON SÍNDROME DE PRADER-WILLI. BORELINA, DANIEL; ESPERANTE, SEBASTIAN; GUTNISKY, VIVIANA; FERREIRO, VERÓNICA; FERRER, MARCELA; GILIBERTO, FLORENCIA; FRANCIPANE, LILIANA; SZIJAN, IRENE

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica y Hospital de Clínicas, UBA

El cromosoma 15 marcador representa la mitad de los pequeños cromosomas supernumerarios detectados. Se relaciona con un fenotipo variable, desde no afectado hasta severo retardo mental. Raras veces el cromosoma marcador derivado de la región proximal de 15q ocurre conjuntamente con el síndrome de

Prader-Willi. El objetivo fue estudiar a una paciente con un pequeño cromosoma 15 marcador (SMC 15) y fenotipo de Prader-Willi (PWS). El SMC(15) fue detectado citogenéticamente y caracterizado por hibridación in situ de linfocitos en metafase con sondas fluorescentes (FISH). Se usó el análisis molecular de microsatélites, ubicados a lo largo del cromosoma 15, para determinar el origen de los cromosomas 15 homólogos y del SMC(15). Los resultados de FISH revelaron que el SMC(15) carece de la región crítica de PWS/AS (loci SNRPN y D15S10) y de todo el brazo q distal (PML). El cariotipo resultante fue: 47,XX,+mar, ish der(15)(D15Z1+, SNRPN-, D15S10-, PML-). El ensayo de microsatélites demostró lo siguiente: 1. La paciente heredó ambos cromosomas 15 maternos debido a una no-disyunción: disomía uniparental materna (UPD) y 2. La ausencia del locus PWS/AS paterno. Conclusiones: La causa de PWS es la UPD, la presencia de 2 alelos maternos diferentes, heterodisomía, sugiere que la no-disyunción ocurrió probablemente en meiosis I. El SMC(15) no contribuye al fenotipo, su origen, en base al estudio citogenético familiar es de novo, por una delección terminal del cromosoma 15 paterno, secundario a la no-disyunción materna y posiblemente como rescate de una concepción trisómica.

574. (3422) CRECIMIENTO Y EXPRESIÓN DE CD40 EN FIBROBLASTOS HUMANOS POR ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS (MACHR). CASANOVA, MARTA BEATRIZ; FURLÁN, CÉSAR; STERIN-BORDA, LEONOR; BORDA, ENRI

Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires

Los mecanismos neurohumorales estimulatorios que median la síntesis de DNA y la expresión de proteínas proinflamatorias en el fibroblasto humano son poco conocidos. En éste trabajo estudiamos los efectos del carbacol sobre la síntesis de DNA (por incorporación de timidina) y la expresión de CD40 (por citometría de flujo e inmunocitoquímica) en fibroblastos humanos obtenidos de prepucio neonatal. Concentraciones crecientes de carbacol estimulan la proliferación y la sobreexpresión del CD40, siendo la concentración óptima 1×10^{-9} M (X: 48 ± 4 , n= 6). Atropina, 4-DAMP, pirenzepina, U-73122 y trifluoperazina (TFP), inhibieron dicho efecto estimulatorio; indicando la participación del mAChR subtipo M1 y M3, de la fosfolipasa C (PLC) y Ca+/calmodulina (CaM) respectivamente. El AF-DX 116, la tropicamida y la staurosporina no tuvieron efecto descartando así la participación del mAChR subtipo M2 y M4 y de la proteína quinasa C (PKC). Asimismo, se verificó un aumento en la acumulación de inosítoles fosfatos (PI) por el agonista, efecto que fue inhibido por el U-73122. El fibroblasto humano expresa mAChR con una Bmax de 382 ± 16 fmol/mg proteína, con una Kd de $0,48 \pm 0,04$ nM. La potencia relativa de los antagonistas muscarínicos selectivos indican una expresión preponderante de mAChR subtipo M3 y M1. Nuestros resultados satisfacen el criterio farmacológico de la coexistencia de mAChR M3 y M1, cuya activación lleva a la proliferación y sobreexpresión de CD40. El mecanismo parece ser secundario a la activación del ciclo de los PI vía la estimulación de PLC, la cual a su vez, induce reacciones en cascada que involucran a la CaM con un incremento del Ca+ citoplasmático, regulando la síntesis del DNA y la expresión del CD40.

575. (3437) LA TRANSLOCACIÓN MITOCONDRIAL DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL CONTRIBUYE A LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR POR DEPRIVACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO EN CELULAS NIH. GALLI, SOLEDAD; LABATO, MARIANA; CARRERAS, MARÍA CECILIA; PODEROSO, JUAN JOSÉ

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital Universitario José de San Martín.

Señales intracelulares involucradas en la progresión del ciclo celular son moduladas por especies reactivas del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el óxido nítrico (NO). Variaciones experimentales en el estado estacionario del H₂O₂ citosólico

pueden resultar tanto en proliferación (< 1 μ M) como en arresto del ciclo celular y apoptosis (>1 μ M). Más del 60% del H₂O₂ citosólico proviene de la mitocondria, por la reacción de dismutación del anión superóxido formado en reacciones de utilización del NO producido por óxido nítrico sintasas citosólicas (NOS) o la NOS mitocondrial (mtNOS). Nuestro grupo de trabajo observó que la actividad y expresión de mtNOS puede ser modulada en diferentes instancias: durante el desarrollo de hígado y cerebro, en la aclimatación al frío y en respuesta a hormonas con cambios paralelos en el estado estacionario del H₂O₂. En estos términos, el objetivo de este trabajo fue estudiar la modulación de mtNOS en respuesta al suero fetal bovino (SFB) y vincularla a la proliferación y/o arresto del ciclo celular, en una línea normal de fibroblastos, NIH. Observamos que 24hs de privación de SFB inducen translocación de NOS citosólica a mitocondrias (mtNOS, + 40%). Asimismo, tras 72 hs de privación de SFB se observa por citometría de flujo un aumento comparable de oxidantes intracelulares concordante con la mayor concentración de NO mitocondrial. La velocidad de crecimiento de NIH en ausencia de SFB es marcadamente menor que con 10% SFB. En ensayos de proliferación, observamos que al suplementar las células con 1-10 mM glutation (antioxidante), se revierte en parte el arresto celular generado por la privación de SFB. Estos resultados sugieren que los factores de crecimiento séricos operan sobre el contenido de mtNOS, modificando la concentración de H₂O₂ citosólico en el estado estacionario cuyo efecto final es la persistencia o abrogación de las señales de proliferación celular.

576. (3490) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA INDUCCIÓN TEJIDO-ESPECÍFICA DE BCL-X EN RESPUESTA A GLUCOCORTICOIDES. ROCHA VIEGAS, LUCIANA; VICENT, GUILLERMO P.; BARAÑO, LINO; BEATO, MIGUEL; PECCI, ADALI

Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA, Buenos Aires, Argentina Centro de Regulación Genómica (CRG), Barcelona, España.

Bcl-X está involucrado en el control de la muerte celular y su expresión genera al menos cinco isoformas por splicing alternativo, con funciones opuestas durante la apoptosis: bcl-X[L] es antiapoptótica y bcl-X[S], proapoptótica. Los glucocorticoides regulan la expresión de bcl-X e influyen en los niveles relativos de bcl-X[L] y bcl-X[S], dependiendo del tejido. Recientemente, demostramos la existencia de elementos de respuesta a esteroides (HREs) en la región promotora del gen bcl-X de ratón. Estos HREs mediarían la acción hormonal induciendo la expresión de bcl-X[L] en células de epitelio mamario HC11, donde los glucocorticoides inhiben la apoptosis. Sin embargo, en timocitos, donde inducen la muerte celular, dexametasona (DEX) inhibe la expresión de bcl-X[L]. Con el objetivo de dilucidar los factores involucrados en la expresión diferencial de bcl-X, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en ambos tipos celulares. Los resultados muestran que luego de tratar las células HC11 con DEX, el receptor de glucocorticoides se une a los HREs antes descritos. Sin embargo, no es capaz de hacerlo en timocitos. Paralelamente, DEX aumenta la interacción de la RNA polimerasa II al promotor de bcl-X en HC11 (DEX/Control = $3,1 \pm 0,2$) y de manera opuesta, en timocitos, la disminuye (DEX/Control = $0,3 \pm 0,1$). En la secuencia promotora de bcl-X se observó un sitio de reconocimiento a factores STAT 5, adyacente a los mencionados HREs. Se analizó la influencia de estos factores en la respuesta a esteroides y se observó que sólo en timocitos, STAT 5B se une al promotor de bcl-X luego del tratamiento con DEX. A su vez, transfecciones transientes mostraron que la presencia de dicho factor es capaz de inhibir la inducción de bcl-X mediada por glucocorticoides (DEX/Control = $4,0 \pm 0,5$ y (DEX+STAT5B)/Control = $1,3 \pm 0,2$). En su conjunto los resultados sugieren que STAT 5B sería uno de los factores involucrados en la expresión diferencial de bcl-X en respuesta a glucocorticoides en timocitos.

577. (3724) EXPRESIÓN DE UN NUEVO GEN RELACIONADO A LA MUERTE CELULAR DURANTE LA DIABETES EX-

PERIMENTAL. GRASSO, D; PARDO, R; ROPOLLO, A; JOST, L; VILCHES, A; GONZALEZ, C; VACCARO, MARÍA I.

Universidad de Buenos Aires Universidad de Buenos Aires. Instituto Universitario CEMIC.

La diabetes tipo I es una enfermedad autoinmune que conduce a la disminución destructiva de las células β del páncreas. La nefropatía diabética es la causa más común de enfermedad renal terminal y el daño de los podocitos constituye una manifestación temprana en dicha patología. Recientemente, describimos el clonado de VMP1 (Vacuole Membrane Protein 1). Este gen codifica una proteína transmembrana localizada en el retículo endoplásmico. Su expresión in vitro induce la formación de vacuolas seguida de la muerte celular. Con el fin de analizar si la expresión de VMP1 esta relacionada a la destrucción de las células β y de los podocitos, ratas Wistar macho fueron tratadas con estreptozotocina 65 mg.Kg(-1) i.p. Páncreas y riñón fueron fijados en formol y glutaraldehído. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. En los cortes histológicos, se evaluó las imágenes digitalizadas de campos seleccionados al azar. Hiper glucemia y glucosuria fueron detectables a las 24h. El análisis por Northern blot evidenció expresión de VMP1 a las 24h en páncreas y a las 48h en riñón de las ratas tratadas. La hibridación in situ utilizando sonda cRNA mostró alta expresión de VMP1 localizada en células β y en podocitos en el total de los campos evaluados para cada experimento. El resultado se controló en cortes paralelos con la sonda sense. La microscopía de campo claro de cortes semifinos reveló temprana agregación de la cromatina y vacuolización citoplasmática en las células en estudio. La muerte celular se analizó mediante TUNEL y microscopía electrónica, detectándose en células β y en podocitos a las 48 y 72h. La hibridación in situ reveló expresión de VMP1 en las células remanentes. La expresión de VMP1 coincidió con la vacuolización citoplasmática y precedió a la muerte en las células β y los podocitos de las ratas tratadas con estreptozotocina. Nuestros resultados sugieren que la expresión de VMP1 esta involucrada en el proceso de destrucción de estas células durante la diabetes experimental.

578. (3733) IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DUOX2 EN BOCIOS CONGÉNITOS POR DEFECTO DE ORGANIFICACIÓN PARCIAL DE YODURO. VARELA, VIVIANA; RIVOLTA, CARINA; GRUÑEIRO-PAPENDIECK, LAURA; CHIESA, ANA; TARGOVNIK, HÉCTOR

Cat. de Genética y Biol. Molecular, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA Cát Génét y Biol Molecular, FFyB-UBA-Div Endocrinología, Htal de Niños "R Gutierrez", Bs As, Argentina

El hipotiroidismo congénito es un desorden endocrino que afecta a 1 cada 3000 a 4000 nacidos vivos. Los defectos de síntesis de hormonas tiroideas se pueden clasificar en los que se producen por defecto de síntesis de tiroglobulina o por defecto a nivel de la organificación del yoduro (total o parcial), asociados a mutaciones en el gen que codifica para peroxidasa tiroidea (TPO) o, menos frecuentemente, en los genes que codifican las enzimas Duox1 y Duox2, que forman el complejo generador de H₂O₂ en la membrana apical del tirocito. Objetivo: identificar alteraciones en el gen Duox2 en pacientes con bocio congénito por defecto de organificación total, (sin mutaciones en el gen de TPO) o presentan bloqueo de organificación parcial. Materiales y métodos: en 16 pacientes genéticamente no relacionados y 50 adultos fenotípicamente sanos (población control), se analizaron las secuencias codificantes e intrónicas flanqueantes de los exones 13, 16 y 20 del gen Duox2 por PCR-SSCP y secuenciación. Resultados: un paciente con defecto de organificación parcial (descarga de perclorato: 60%) presentó un patrón anómalo en SSCP, en el producto de amplificación del exón 20; por secuenciación se identificó una nueva mutación, la transición 2840-2A>G, en estado heterocigota, que modifica la secuencia consenso aceptora de splicing del intrón 19. El análisis del ADN de sus padres, con-

firmó el origen paterno de la mutación. Una hermana afectada, su hijo, y dos hermanos sanos, presentaron la mutación en estado heterocigota. En el exón 16 se detectaron 2 polimorfismos: 2033 A>G (CAG>CGT)(His678Arg) y 2102 G>A (CGA>CAA) (Arg701Gln). Se identificó una nueva mutación, la transición 2840-2A>G, en el intrón 19 del gen Duox2, en un bocio congénito por defecto de organificación parcial de yoduro. La presencia de la mutación en individuos fenotípicamente sanos, confirma el carácter recesivo de esta patología hereditaria.

METABOLISMO Y NUTRICION III

579. (3241) ALTERACIONES DEL TEJIDO ADIPOSO Y DISFUNCION DE LA CELULA β EN RATAS DISLIPEMICAS INSULINO RESISTENTES. EFECTOS DEL ACEITE DE HIGADO DE BACALAO (AHB) DIETARIO. D'ALESSANDRO¹, MARÍA E.; ROSSI¹, ANDREA; SORIA¹, ANA; BASABE², JUAN C.; LOMBARDO¹, YOLANDA B.

¹Fac. Bqca. y Cs. Biol. UNLitoral, Santa Fe y ²CEDIE Buenos Aires.

Ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan hiperglucemia, resistencia insulínica, elevados AGNE y triglicéridos (Tg) plasmáticos, hipertrofia del tejido adiposo y ausencia del primer pico de secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa. Los objetivos propuestos son: 1-Analizar si cambios en niveles de triglicéridos (Tg) y actividad enzimática piruvato dehidrogenasa (PDH) del páncreas contribuyen a la disfunción de la célula β y 2- Evaluar si cambios en el tipo de grasa dietaria: aceite de maíz (AM) por AHB puede mejorar la hipertrofia, anormal distribución de adipositos y contenido de Tg del tejido adiposo epididimal y el patrón de secreción de insulina bajo estímulo de glucosa. Ratas machos Wistar recibieron DRS (%p/p: sacarosa 62.5, AM 8 y proteínas 17) durante 180 días, para luego dividirse en 2 lotes: Lote I continuó con la DRS durante 60 días más. Lote II siguió con DRS donde el 8% de AM se reemplazó por 7% AHB+1%AM (día 180 a 240). El lote control (DC) recibió (%p/p almidón 62,5, AM 8; proteínas 17). Resultados: media \pm SEM (n=6). Páncreas (células β): Tg: (ng/islote) DC: 50 \pm 6, DRS:148 \pm 10, DRS+AHB: 46 \pm 4, PDHa (% del total) (forma activa del complejo PDH): DC: 75 \pm 8, DRS: 30 \pm 4, DRS+AHB: 80 \pm 6. Epidídimo: Tg: (μ mol/célula): DC: 0.3 \pm 0.01, DRS: 0.7 \pm 0.05, DR+AHB: 0.4 \pm 0.03. Peso epidídimo (g/100g rata): DC: 1.7 \pm 0.2, DRS: 3.6 \pm 0.1, DRS+AHB: 2.5 \pm 0.2. La alterada lipólisis basal y distribución de adipositos en DRS mejoran con la sustitución del tipo de grasa dietaria (DRS + AHB). Glucemia, dislipidemia, resistencia insulínica y patrón de secreción de insulina se normalizan en DRS+AHB. En conclusión, los datos sugieren que alteraciones metabólicas del tejido adiposo y la lipotoxicidad contribuyen al deterioro de la célula β y la resistencia insulínica. Esto es consistente con la reversión de estas alteraciones por la adición de ácidos grasos polinsaturados n-3 de origen marino dietarios.

580. (3380) COMPOSICIÓN DE LECHE HUMANA Y SU RELACIÓN CON EL ESTADO NUTRICIONAL MATERNO. MARIN, MARÍA CRISTINA; SANJURJO, ADRIANA; RODRIGO, MARÍA ADELAIDA; TACCONI DE ALANIZ, MARÍA JOSEFA

INIBIOLP-Facultad de Ciencias Médicas CEREN-CIC

La leche humana contiene glúcidos, proteínas y lípidos, mayoritariamente triacilglicéridos, cuyos ácidos grasos constituyen el único componente que puede ser alterado por la dieta materna. Los ácidos grasos polinsaturados influyen en la síntesis de lípidos estructurales y en el desarrollo neural, y llegan al lactante con la leche, incluyendo los ácidos araquidónico y docosahexaenoico. Se conoce la relación entre este aporte y el desarrollo del sistema nervioso central. Dada la escasez de datos locales, se consideró de interés analizar la composición de leche en nuestro medio en función del grado de nutrición mater-

no. Las muestras se obtuvieron de madres normales N, con sobrepeso S, y obesas O, de acuerdo al índice de masa corporal. Todas amamantaban lactantes de término y eutróficos. Se determinó el contenido en proteínas por espectrofotometría, y de lípidos totales por gravimetría luego de su extracción por el método de Folch. Se analizó la composición en ácidos grasos por cromatografía gas-líquido. Los resultados muestran un mayor contenido de lípidos totales, expresado en g%, en las madres O(9,8), respecto a N(6,9) y S(7,5), sin diferencias en el contenido proteico. En los ácidos grasos, se observó un aumento en el contenido de ácido linoleico en las obesas (O=20,7; N=16,6; S=19,1), que se corresponde con un aumento en el total de ácidos n-6 y polinsaturados, lo que reflejaría una alteración en el metabolismo relacionada con la obesidad. Concluimos que el grado de nutrición tiene ligeras influencias en la composición en ácidos grasos de la leche, y comparando con datos de otro origen, se destaca en nuestras madres, independientemente del grado de nutrición, el escaso contenido en ácidos n-3, imprescindibles para el desarrollo del sistema nervioso, (entre 0,7 y 0,8 % del total).

581. (3408) ACCIÓN DE L-NAME SOBRE EL CONSUMO DE O₂ SISTEMICO (VO₂) DURANTE LA ADAPTACIÓN AL FRÍO.
PERALTA, JORGE GUILLERMO; FINOCCHIETTO, PAOLA;
PODEROSO, JUAN JOSE

Laboratorio de metabolismo del oxígeno y hospital de Clínicas UBA

El óxido nítrico (NO) produce efectos inhibitorios cardiovasculares (ICV) y en el metabolismo oxidativo (IMO) y participa en la adaptación al frío. En ratas, la oxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) exhibe diferente expresión y actividad en el curso de la exposición a 4°C. Inicialmente, mtNOS disminuye en hígado y músculo, aumenta el VO₂ y disminuye el peso corporal y después de 5-7 ds mtNOS aumenta en ambos tejidos, se normaliza el VO₂ y aumenta el depósito de grasa. La administración de L-NAME, bloqueante no selectivo de NOS, disminuye la acción mitocondrial del NO pero disminuye el flujo sanguíneo superponiendo ICV e IMO con efectos opuestos sobre VO₂. Con el objeto de separar ambos efectos se estudió el VO₂ sistémico en ratas Sp-Dawley (250-300 g) mediante un analizador de O₂ en sistema abierto, en 3 grupos de animales (n=6) en períodos representativos de diferente actividad de mtNOS: Gc (control-ratas a 22°C), G2 (5 días a 4°C) y G3 (21 días a 4°C). En cada grupo se administró 30 mg/kg de peso de L-NAME i.p. y se determinó nuevamente VO₂ a 90 minutos y 24hs. El VO₂ describió una curva de ascenso/descenso significativo, en ml/kg/peso-0.75/min Gc: 14.83 ± 0.48; G2: 22.29 ± 0.28 (p<0.05 vs Gc); G3: 19.42 ± 0.75. Tras 90 min de L-NAME el VO₂ sistémico cayó en forma significativa en los tres grupos, pero a las 24 hs y tras la recuperación hemodinámica, VO₂ sólo aumentó en G3 (+ 15%, p<0.05) con mt NOS aumentada. Los resultados indican que la utilización de bloqueantes no selectivos de la NOS de acción prolongada define IMO o ICV en relación a la diferente cinética de la respuesta farmacológica.

582. (3661) DESEQUILIBRIOS NUTRICIONALES Y TIMO.
FELIU, MARÍA SUSANA; SLOBODIANIK, NORA

Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Se analizan los efectos que provocan los desequilibrios nutricionales sobre el contenido de DNA y la actividad de ADA, PNP y 5'NT-enzimas relacionadas con los linfocitos T. Ratas Wistar al destete (21-23 días), fueron alimentadas durante 18 días con dieta: 1- libre de proteínas (pérdida del 25% del peso inicial, LP); 2- conteniendo como fuente proteica harina de maíz(6,5% de proteína, M); 3- conteniendo como fuente proteica caseína (6,5% de proteína, CAS); 4- stock (control, C). Al final de la experiencia, los animales fueron pesados y sacrificados, extrayéndoseles y pesando el timo. Se prepararon suspensiones celulares y se determinó el contenido de DNA(método de Burton) y la actividad

de las enzimas ADA, PNP(técnica de Wu & Marlliss modificada) y 5'NT(técnica Wiener).Se calculó el tamaño celular[TC=Peso timo(mg)/No núcleos(millones)].Los resultados(X ± DE) : DNA(mg/ órgano); TC; ADA(μmol de ác. Úrico x 10⁻¹/P) PN P(μmol de ác. úrico x 10⁻¹/P); 5'NT(U/P) fueron respectivamente:

LP 0,3±0,1a 0,61±0,18a 17,0±2,6a 11,5±4,2a 2,35±0,79
M 2,6±0,5b 0,18±0,03b 25,0±6,4b 7,2±1,2a 2,76±0,22
CAS 4,0±0,8c 0,24±0,06b 16,8±3,5^a 3,4±0,9b 2,32±0,50
C 9,2±1,0d 0,23±0,02b 9,1±3,0c 3,9±1,0b 2,58±0,80
P= Peso timo (mg)/ Peso corporal 0,75 (g)

Las medias que no presentan una letra a,b,c,d en común son diferentes a p<0.01. Los resultados muestran que tanto la administración al destete, de dieta carente de proteínas, como con baja concentración proteica (CAS) y baja calidad proteica(M) afectan la proliferación celular y aumentan la actividad de ADA y PNP en timo, sin modificar la actividad de 5'NT. El aumento podría deberse a un mecanismo alternativo en la ruta de las purinas, que evitaría la formación de productos potencialmente tóxicos para los linfocitos T. Sólo la malnutrición proteica severa al destete induce hiperplasia celular.

583. (3995) HOMOCISTEINA, ESTRES OXIDATIVO DE LDL Y FIBRONECTINA MUJERES POSTMENOPAUSICAS.
SANGUINETTI, S¹; ROTEMBERG, R¹; LOPEZ, G¹; BERG, G¹; BASILIO, F³; MUZZIO, L¹; ALVAREZ, E²; WIKINSKI, R¹; SCHREIER¹

¹Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Dept. Bioquímica Clínica ²Cát. de Inmunología, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA; ³Centro de Estudios en Ginecología y Rep.

Niveles elevados de homocisteína circulante (H) constituyen un factor de riesgo independiente para enfermedad cardiovascular y promueven la oxidación de LDL. La fibronectina plasmática (F) es un indicador de degradación de matriz extracelular. El descenso estrogénico en la postmenopausia incrementa el riesgo cardiovascular. Nuestro objetivo fue determinar H, F y resistencia de LDL a la oxidación en mujeres postmenopáusicas (MPM) sin signos de enfermedad cardiovascular. Se obtuvo plasma de 15 MPM (42 a 60 años) y 15 controles premenopáusicas (23 a 45 años) (MpreM), se aisló LDL (d=1.019-1.063g/ml). Se determinó H por FPIA y F por un ELISA no comercial, de captura por anticuerpo monoclonal EP5 de ratón. La resistencia de LDL a la oxidación se midió provocando la oxidación de LDL (10mg/dl-prot) con 10μM Cu²⁺, monitoreando la cinética de producción de dienos conjugados a 234nm y calculando tiempo lag (T). Se observó un incremento de H (Media±ES) en MPM vs MpreM: 15.5±2.1 vs 9.7±0.8 μmol/l, p<0.02. F fue mayor en MPM que en MpreM: 29.6±2.0 vs 24.2±1.6 μmol/l, p<0.05. No se observó diferencia en T entre MPM: 59±4.3 vs MpreM: 65±2.5 min, p=0.3, pero se encontraron correlaciones inversas entre H y T, r=-0.43, p<0.05 y entre F y T, r=-0.44, p<0.05. Además, H correlacionó positivamente con F, r=0.44, p<0.05, en MPM + MPreM. Se concluye que el aumento de homocisteína en mujeres postmenopáusicas sin signos de enfermedad cardiovascular, produciría injuria endotelial que se evidencia por el pasaje de fibronectina de la matriz extracelular de la íntima arterial al plasma. Las correlaciones del estrés oxidativo de LDL con homocisteína y fibronectina plasmáticas denotarían la contribución de LDL oxidadas como marcadores de disfunción endotelial.

584. (3997) COLESTEROL NO-HDL NO ES BUEN MARCADOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA HEMODIALIZADOS (IRC).
GONZALEZ, A I; BERG, G; ELBERT, A; ZAGO, V; WIKINSKI, R; SCHREIER, L

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Depto. Bioquímica Clínica, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA.

Los pacientes con insuficiencia renal crónica bajo hemodiálisis (IRC) tienen riesgo aumentado de aterosclerosis y alta incidencia de muerte por enfermedad cardiovascular. Actualmente el

colesterol (col) no-HDL (col-VLDL+col-LDL+col-IDL) es considerado un fuerte predictor de enfermedad cardiovascular en hombres y mujeres con hipertrigliceridemia. El hallazgo del incremento en la prevalencia de lipoproteínas aterogénicas en pacientes IRC, aún con valores normales de col-LDL, lleva a considerar al col no-HDL un parámetro útil para evaluar el riesgo cardiovascular en estos pacientes. Hemos aplicado el cálculo del col no-HDL en 50 pacientes IRC (tiempo de diálisis mediana 8 (1-55) meses; 25 diabéticos; 21 varones) y 20 controles sanos (10 varones). No hubo diferencias en BMI entre IRC y controles. IRC presentaron mayor edad (50 ± 1.9 vs 29 ± 1.8 años, $p < 0.0001$) y un perfil lipídico-lipoproteico más aterogénico (IRC vs controles, media \pm ES, mg/dl): triglicéridos (183 ± 13.2 vs 79 ± 7.4), col-HDL

(42 ± 2.0 vs 54 ± 3.0), col-IDL (10 ± 0.7 vs 4 ± 0.4), col-VLDL (45 ± 3.1 vs 20 ± 1.5), $p < 0.05$ ajustados por edad. Sin embargo, no hubo diferencias en col-LDL (119 ± 7.54 vs 111 ± 5.99) ni col no-HDL entre grupos (156 ± 7.2 vs 138 ± 7.7) $p = ns$. Para detectar cual de los parámetros evaluados constituye un mejor marcador de riesgo cardiovascular entre pacientes y controles se realizó una curva ROC. El col-IDL mostró la mayor exactitud y performance, mientras col no-HDL mostró una curva cercana a 45° . En la práctica clínica, col-VLDL puede ser un marcador alternativo porque es técnicamente más accesible que col-IDL. A pesar de su conveniencia, por no requerir el ayuno de 12 horas y su cálculo fácil, col no-HDL no fue discriminador de riesgo cardiovascular y no permitió apreciar el aumento en col-VLDL ó IDL en IRC.