

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

BIOLOGÍA GENERAL 1: ZOOLOGÍA

1. (6665) CLONADO Y EXPRESIÓN DE LA CITOCROMO P450 AROMATASA CEREBRAL Y RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (ALFA Y BETA) EN EL PEJERREY ODONTESTHES BONARIENSIS. STROBL, PABLO; MIRANDA, LEANDRO; MONCAUT, NATALIA; SOMOZA, GUSTAVO

IIB-INTECH, Chascomús, Buenos Aires.

En peces teleosteos, el estradiol (E[2]) está asociado a distintos eventos fisiológicos: vitelogenesis, comportamiento y diferenciación sexual. Muchas funciones cerebrales como la proliferación, morfología, supervivencia y sinaptogénesis neuronal dependen de la síntesis local de E[2] a partir de testosterona por aromatasa (P450arom). Esta enzima ha sido detectada en distintos tejidos, principalmente en cerebro de peces en donde se han descrito dos variantes: aromatasa gonadal (P450aromA) y cerebral (P450aromB). El objetivo de este trabajo fue clonar el ADN copia de P450aromB, ER- α y ER- β y evaluar su expresión en diferentes tejidos y áreas cerebrales para estudiar la regulación estrogénica de la diferenciación sexual y reproducción en pejerrey. El ADN copia (2503pb) conteniendo el ORF (1506pb) de P450aromB fue obtenido de una genoteca de cerebro e hipófisis de pejerrey. Fragmentos parciales de ER- α y ER- β fueron clonados por RT-PCR, al igual que para P450aromB y utilizados para evaluar su expresión en distintos tejidos. Se demostró expresión de P450aromB, en cerebro, hipófisis y riñón; mientras que ER- α y ER- β se expresan en riñón, bazo, hígado, cerebro, hipófisis y gónadas en ambos sexos. ER- α se expresa en branquia de hembra y ER- β en la de ambos sexos. Se evaluó por RT-PCR semicuantitativa la expresión de estos tres genes en cerebro anterior, medio, posterior e hipófisis de ambos sexos, utilizando β -actina como gen de referencia. Se demostró mayor expresión de P450aromB ($p < 0.01$) en las áreas anteriores y media de machos; mientras que no hubo diferencias en su expresión en áreas cerebrales posteriores e hipófisis. Se demostró alta expresión de ER- α y ER- β en hipófisis de ambos sexos. La expresión cerebral dimórfica de P450aromB en pejerrey sugiere una acción diferencial de E[2] en áreas cerebrales relacionadas con la reproducción. La elevada expresión de ER en hipófisis sugiere que E[2] es importante en la regulación de hormonas hipofisarias.

2. (6741) EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN PEJERREY. BLASCO, MARTIN; MIRANDA, LEANDRO; SOMOZA, GUSTAVO

IIB-INTECH, Chascomús, Buenos Aires.

La hormona de crecimiento (GH) tiene numerosas funciones en vertebrados, entre las que se destaca la estimulación del crecimiento. En salmónidos y algunos teleosteos de aparición tardía, la hormona de crecimiento está involucrada en los procesos de osmorregulación para la adaptación a medios hiperosmóticos. Dado que el pejerrey es un pez eurihalino, la GH podría ser uno de los factores involucrados en la respuesta a variaciones de la salinidad del medio. El objetivo de este trabajo fue estudiar las variaciones en la expresión de GH en relación a la salinidad del medio utilizando RT-PCR semicuantitativa. De este modo se relacionaron los niveles de ARN mensajero de GH

con β -actina a diferentes salinidades (3, 7, 14 y 21 ‰) y se estudió su evolución temporal (7 y 14 días). Para este experimento se utilizaron juveniles de pejerrey de 250 días de edad. Se extrajo ARN de cada hipófisis, se retrotranscribió y se realizaron RT-PCRs. Los productos de amplificación fueron analizados en geles mediante densitometría. En el día 14, los niveles relativos de ARN de GH en medios con 14‰ de sal presentaron el mayor nivel mientras que para 21‰ en el mismo tiempo experimental este nivel disminuyó significativamente ($p < 0.05$). En el día 7 experimental no se presentaron diferencias significativas en ninguna de las condiciones ensayadas. Los mensajeros de ARN de GH de animales mantenidos en soluciones hiperosmóticas respecto del medio interno presentan una disminución de los niveles de GH. Los cambios para condiciones isosmóticas e hiposmóticas no fueron significativos en este experimento pero no por eso se descarta un aumento en el caso de medios isosmóticos. Teniendo en cuenta que en salmónidos los niveles de mensajero de GH reflejan los niveles circulantes de esta hormona, las variaciones de los mensajeros de GH producido por la salinidad del medio puede ser uno de los factores que afectan el crecimiento del animal. Por otro lado el incremento excesivo de la salinidad puede afectar el crecimiento del animal dada la disminución de GH.

3. (6803) VITELOGENINA EN PEJERREY (ODONTESTHES BONARIENSIS): PURIFICACIÓN, PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS Y DESARROLLO DE UN TEST DE ELISA. FERRARO, MARCELA A.; GÓMEZ-CASATI, DIEGO F.; MIRANDA, LEANDRO A.; SOMOZA, GUSTAVO M.

Univ. Nac. de San Martín, Chascomús. Pcia de Bs.As.

La vitelogenina (Vtg) es una proteína producida por los peces hembra que es precursora de las proteínas de reserva del huevo. Su expresión se encuentra bajo el control del estradiol (E2) de origen ovárico. Por este motivo las perturbaciones en su expresión se utilizan como indicadores de disrupción endócrina producida por contaminantes estrogénicos o xenoestrógenos (tales como pesticidas, agroquímicos, desechos de origen industrial y urbano). El pejerrey es una especie de importancia económica (pesca deportiva y consumo) en la provincia de Bs.As. y ha demostrado ser altamente sensible a la contaminación ambiental. El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un test de ELISA específico para vitelogenina de pejerrey con el objeto de utilizarla como biomonitor. La vitelogenina de pejerrey fue purificada a partir de suero de pejerreyes macho inducidos con E2, por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-sepharosa). La purificación fue monitoreada por geles de poliacrilamida y Western-blot utilizando un antisuero anti Vtg de lubina europea. La vitelogenina de pejerrey presenta una masa molecular aparente de 180 Kd en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS), correspondiendo a las dos subunidades homólogas que conforman la proteína completa. Una vez purificada, esta proteína fue utilizada para obtener anticuerpos policlonales en conejo. La especificidad del anticuerpo producido fue determinada por Western-blot y no presenta reactividad cruzada con proteínas presentes en sueros de ejemplares machos sin inducir con E2. Este anticuerpo anti-vitelogenina se usó como reactivo para desarrollar un test de ELISA específico para pejerrey. El límite de detección para el ensayo de ELISA resultó de 10 ng/ml de vitelogenina purificada.

4. (6808) CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FSH- β Y LH- β EN EL PEJERREY BONAERENSE. MIRANDA, LEANDRO; SOMOZA, GUSTAVO; STRÜSSMANN, CARLOS

IIB-INTECH (CONICET-UNSAM). Tokyo University of Marine Science and Technology.

En peces teleosteos las gonadotropinas (GtHs), hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) secretadas por la hipófisis son las hormonas más importantes en la regulación de la gametogénesis y la maduración gonadal. Las GtHs son glicoproteínas que están formadas por dos subunidades: la alfa, común a FSH y LH en una misma especie y la subunidad beta que difiere y les confiere especificidad biológica. En el presente trabajo se describe el clonado molecular y el análisis de la secuencia de las subunidades β de FSH y LH en el pejerrey *Odontesthes bonariensis*, un desovador múltiple con importancia económica en la región. Las secuencias completas de los ADNc codificantes para FSH- β y LH- β se obtuvieron mediante 3' y 5' RACE a partir de la retrotranscripción de ARN total de hipófisis de ejemplares de pejerrey sexualmente maduros. El ADNc para FSH- β y LH- β de pejerrey está constituido por 460 y 558 pb con un marco de lectura abierto de 345 y 450 pb respectivamente. De la comparación con la secuencia aminoácídica obtenida en otros peces teleosteos podemos deducir para FSH- β de pejerrey un péptido señal de 15 aminoácidos (aa) y un péptido maduro de 100 aa mientras que LH- β estaría constituida por un péptido señal de 32 aa y un péptido maduro de 118 aa. La posición de las 12 cisteínas y un posible sitio de glicosilación identificado en pejerrey para LH- β se encuentran completamente conservados en peces teleosteos. Sin embargo, FSH- β de pejerrey presenta también 12 cisteínas cuya posición no se encuentra altamente conservada en peces teleosteos. Además, la identidad aminoácídica entre pejerrey FSH- β y el resto de peces varía entre 24.6 y 62.8% mientras que para LH- β estos valores se encuentran entre 49.8 y 72.4%. Estos resultados muestran que la estructura primaria de LH- β ha sido mejor conservada que la de FSH- β durante la evolución de los peces teleosteos. La caracterización de estos genes es de importancia para estudiar sus variaciones en el ciclo reproductivo.

5. (6817) DMRT1 COMO MARCADOR DE SEXO EN EL PEJERREY ODONTESTHES BONARIENSIS. FERNANDINO, JUAN; GUILGUR, GASTÓN; STROBLMAZZULLA, PABLO; SOMOZA, GUSTAVO

Lab. Ictiofisiología IIB-INTECH

En el pejerrey bonaerense, el sexo fenotípico está determinado por la temperatura a la que son expuestas las larvas en un período crítico, fenómeno conocido como Determinación Sexual por Temperatura (TSD). En mamíferos se han identificado varios genes autosomales envueltos en la vía de diferenciación sexual y muchos de ellos también han sido identificados en distintos vertebrados, como SOX9, DMRT1, SF1 y AMH. DMRT1 (Doublesex Maleabnormal-3 Related Transcription factor-1) es un factor de transcripción que contiene un motivo de unión al ADN, dominio DM, similar al doublesex (dsx) identificado en *Drosophila* y a mab-3 en *Caenorhabditis elegans*, que juegan un rol crucial en la diferenciación sexual a macho. La delección de este gen en humanos causa reversión sexual de macho a hembra. En embriones de ratón la expresión de DMRT1 es similar en la cresta genital indiferenciada en ambos sexos pero en estadios más avanzados de diferenciación muestra un claro dimorfismo y sólo se expresa en testículo. La expresión de este gen fue también estudiada en tres especies de reptiles con TSD en donde DMRT1 se expresa sólo en temperaturas formadoras de machos. En peces teleosteos también se ha caracterizado este gen y su expresión y está generalmente asociado a macho pero en trucha arco iris su expresión fue detectada tanto en testículo como en ovario, aunque en menor medida. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el sitio de expresión de DMRT1 en pejerrey por RT-PCR. Se utilizaron peces de pejerrey de 7 meses de planteles monosexo y mixtos generados por temperatura. Además se to-

maron adultos en diferentes estadios gonadales. Una gonada fue utilizada para realizar cortes histológicos y la otra para realizar RT-PCR con cebadores específicos. Se determinó también la expresión de DMRT1 en distintos tejidos. DMRT1 presenta una expresión dimórfica, ya que sólo se expresa en tejido testicular en todos los estadios analizados y puede considerarse como un marcador de sexo en el pejerrey. Se estudiará su expresión en el período crítico de TSD.

6. (7097) SUSCEPTIBILIDAD A LA LIPOPEROXIDACION DE MITOCONDRIAS DE RIÑON Y CEREBRO DE PALOMA (COLUMBA LIVIA). GUTIERREZ, ANA M (1); REBOREDO, GUILLERMO R (1); MOSCA, SUSANA M (1); CATALÁ, ANGEL (2)

Cátedra de Fisiología Animal. Fac Cs Naturales y Museo. UNLP. (1) Cát de Fisiología Animal. Fac Cs. Nat. y Museo. (2= Cát de Bioquímica. Fac. Cs. Veterinarias. UNLP

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostramos la composición lipídica y la sensibilidad a la lipoperoxidación de las mitocondrias de hígado de la paloma casera *Columba livia*. El contenido de ácidos grasos de membranas biológicas difiere entre especies y tejidos de la misma especie. El objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil lipídico y la susceptibilidad a la lipoperoxidación de las mitocondrias de riñón y cerebro de la paloma. Estas organelas fueron incubadas en un sistema ascorbato-Fe⁺⁺ in vitro, midiendo quimioluminiscencia y variación en la composición de los ácidos grasos. El contenido de los ácidos grasos saturados y no saturados fue de aproximadamente 50% en las mitocondrias de ambos órganos. La contribución de cada ácido al total de ácidos grasos no saturados fue diferente en los dos órganos. Los porcentajes de C18:2n6, C20:4n6 y C22:6n3 fueron 20.5 \pm 0.9%, 14.0 \pm 0.3% y 1.9 \pm 0.1% en mitocondrias de riñón y 0.8 \pm 0.2%, 12.7 \pm 1.1% y 13.1 \pm 2.0% en mitocondrias de cerebro. La relación 20:4/18:2 en mitocondrias de cerebro fue aproximadamente 23 veces mayor que en riñón. Las organelas de ambos órganos fueron afectadas por el proceso de peroxidación lipídica, siendo la emisión lumínica significativamente mayor en las mitocondrias de cerebro (1.3 veces la de riñón). Los resultados muestran que las mitocondrias de riñón de paloma son menos susceptibles al proceso de lipoperoxidación que las mitocondrias de cerebro. Esta diferencia podría atribuirse a que las mitocondrias de riñón presentan un menor contenido del ácido altamente no saturado, C22:6n3 y un mayor contenido de un ácido menos saturado, el C18:2n6.

7. (7156) REGULACION DE VOLUMEN EN HEPATOCITOS DE GOLDFISH. PAFUNDO, DIEGO E.; PÉREZ-RECALDE, MERCEDES; FAILLACE, MARIA PAULA; KRUMSCHNABEL, GERHARD (1); SCHWARZBAUM, PABLO J.

IQUIFIB. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), Junin 856, Buenos Aires. (1) Department of Zoology and Limnology, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria.

En células hepáticas, la exposición a medios hipotónicos induce un rápido aumento de volumen, salida de ATP y disminución regulatoria de volumen (RVD). Se ha reportado que el ATP secretado, y la adenosina que resulta de su desfosforilación extracelular, pueden interactuar con receptores P1 (adenosina) y P2 (ATP) para modular el RVD. En el goldfish, a diferencia del resto de los vertebrados, los hepatocitos sometidos a medios hipotónicos no presentan RVD. El objetivo del presente estudio es verificar si en hepatocitos de esta especie el RVD puede ser inducido y modulado por nucleótidos y adenosina extracelulares. El volumen celular fue estimado por microscopía de fluorescencia. El RVD fue evaluado a partir de su velocidad inicial (vRVD) y a los 40 min de iniciada la regulación volumétrica (RVD40). Resultados: en presencia de medio 190 mosM (HYPO), se observó un aumento de volumen pero ausencia de RVD, mientras que HYPO + 5 μ MATP indujeron un RVD de 1.83 \pm 0.24 (vRVD) y 37.5 \pm 3.9 (RVD40). En presencia de HYPO y concentraciones variables de ATPgS (análogo no hidrolizable del ATP), tanto el

vRVD como el RVD40 mostraron un aumento dependiente de la concentración del nucleótido (0-50 μM). En medios HYPO + 5 μM ATPgS, el agregado de 100 μM de suramina y cibacron blue (antagonistas de receptores P2) causó una disminución del RVD del 87% (vRVD) y 63% (RVD40). Por otro lado, en presencia de HYPO + 5 μM ATPgS el agregado de 5 μM adenosina redujo el RVD en 53% (vRVD) y 25% (RVD40); esta inhibición fue revertida por 100 μM 8-SPT (antagonista de receptores P1). Si bien en hepatocitos de goldfish sometidos a un medio hipotónico no se verifica RVD, este puede ser activado por ATP y ATPgS e inhibido por la adenosina. Ambos efectos están mediados por receptores P. Con subsidios de F. Antorchas, UBA, CONICET, ANPCyT (11017) y FWF Austria (P16154-B06).

8. (7158) DETECCIÓN DE VITELOGENINA DE CAIMAN LATIROSTRIS (YACARÉ OVERO) COMO BIOMARCADOR DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR XENOESTRÓGENOS. REY, FLORENCIA; RAMOS, J GUILLERMO; STOKER, CORA; BUSSMANN, LEONARDO E; LUQUE, ENRIQUE H; MUÑOZ DE TORO, MÓNICA

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

En nuestro país los ecosistemas hídricos están amenazados por contaminantes agroindustriales con actividad hormonal. La selección de especies centinelas y de biomarcadores es crítica para el diseño de estrategias de evaluación de contaminación ambiental. La vitelogenina (Vtg) es una proteína producida en hígado de especies ovíparas en respuesta a estrógenos. Nuestro objetivo fue desarrollar un ELISA para detectar Vtg de yacarés y validar su uso como biomarcador de contaminación ambiental por xenoestrógenos. Para obtener Vtg plasmática se inyectaron hembras juveniles con una dosis diaria (1mg/kg) de 17 β estradiol (E2) durante 7 días. La Vtg se purificó por precipitación con EDTA-MgCl₂ seguida de cromatografía de intercambio iónico. Con la Vtg purificada se generaron anticuerpos en conejos. El antisero se purificó por doble cromatografía de afinidad: unión a proteína A, seguida de unión a matrices ligadas con Vtg. Se diseñó un ELISA de competición por captura de anticuerpo ligando Vtg a fase sólida. El límite de detección del ELISA fue 1 ng/ml, la sensibilidad -0.202 ml/ μg y el rango de linealidad de 6 a 1563 ng/ml. La concentración de Vtg en plasma de hembras tratadas con una dosis alta de E2 (7 días con 1mg/kg/día) fue 25.6 mg/ml. La administración a yacarés machos de bajas dosis de E2, una única dosis de 1mg/kg o dos dosis separadas 7 días, indujeron 0.38 mg/ml y 4.65 mg/ml de Vtg en plasma, respectivamente. En machos y hembras juveniles, los niveles basales de Vtg fueron no detectables. El efecto de priming observado en machos demuestra la alta sensibilidad del yacaré a bajas concentraciones de xenoestrógenos. El ELISA desarrollado permitirá monitorear la exposición de poblaciones silvestres de yacaré a estrógenos ambientales y utilizar a esta especie como centinela.

9. (7385) SOMATOLACTINA: ¿HORMONA DE LA ADAPTACIÓN AL ENTORNO EN PECES TELEÓSTEOS? CÁNEPA, MAXIMILIANO; PANDOLFI, MATÍAS; CAÑONES, CRISTIAN; MAGGESE, CRISTINA; VISSIO, PAULA

Laboratorio de Embriología Animal, DBBE, FCEN, UBA.

Los peces teleósteos son un modelo muy interesante para el estudio de la regulación hipotálamo-hipofisaria. Carecen de un sistema portal hipofisario y las neuronas hipotalámicas inervan directamente las células hipofisarias. En la pars intermedia (PI) de peces teleósteos se encuentran la hormona melanocito estimulante (MSH) y la hormona somatolactina (SL). SL está estructuralmente relacionada con la hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL) y aunque se la ha involucrado en diferentes procesos biológicos, su función definitiva aún no se conoce. Objetivo: analizar si existe relación entre SL y la adaptación a la coloración del entorno en el pez cíclido *Cichlasoma dimerus*. 90 peces juveniles fueron transferidos a peceras con paredes blan-

cas (B) o negras (N) durante 15 días. Luego de este tiempo 15 animales de cada tratamiento fueron procesados para inmunocitoquímica (ICQ) con el objetivo de poner en evidencia las células productoras de SL y determinar el área celular inmunomarcada y el número de células inmunoreactivas a SL (ir-SL). A los 30 animales restantes de cada tratamiento se les extrajeron las hipófisis, se homogeneizaron y se realizó Western Blot para determinar los niveles de ir-SL en ambas condiciones experimentales. Los animales expuestos a un entorno oscuro mostraron una pigmentación más oscura y tanto el área promedio de las células ir-SL como el número por sección (7 μm) aumentaron significativamente comparado con los animales provenientes de entorno claro (27.39 \pm 2.09 μm^2 , 23 \pm 3 (N) vs. 16.61 \pm 1.23 μm^2 , 7 \pm 1 (N), $P < 0.0005$). Los niveles de ir-SL por western blot mostraron también diferencias significativas ($P < 0.02$). Por otra parte, por doble ICQ se encontró una asociación entre las fibras productoras de hormona concentradora de melanina (MCH) provenientes del núcleo lateralis tuberis (NLT) del hipotálamo y las células de SL de la PI. SL estaría involucrada en la adaptación de los peces teleósteos a su entorno. La síntesis y/o liberación de SL podría estar regulada por MCH.

10. (7521) ¿LA ORIENTACIÓN BIOLÓGICA DEL POLIMODAL COLABORA EN LA INSERCIÓN A CARRERAS AFINES EN LA UNIVERSIDAD? KONCURAT, MIRTA; GOMEZ, BETTINA; GARRO, ADRIANA; WILLIAMSON, DELIA; RIESCO, OSCAR; ALONSO, GABRIELA; BRUNI, MARÍA

UNLPam. Facultad de Ciencias Veterinarias. Gral Pico, La Pampa. Universidad Nacional de la Pampa.

Pasar del nivel medio educativo a la Universidad conlleva superar diferentes circunstancias. Una variable importante a considerar es tratar de evaluar si los conocimientos previos necesarios para iniciar estudios universitarios con orientación biomédica fueron brindados por la escuela media. Las evaluaciones diagnósticas mostraron que los alumnos ingresantes cuentan, en general, con un escaso desarrollo de estrategias de aprendizaje. A esta situación problemática se le suma el hecho de que los alumnos egresan del polimodal con diferentes orientaciones, que no siempre coinciden con la carrera elegida. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el desempeño de alumnos provenientes de escuelas polimodales con y sin orientación biológica durante la cursada y en la aprobación de la asignatura Biología General que se dicta en el primer cuatrimestre del primer año de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam). En el año 2004, de un total de 177 inscriptos, abandonaron por diferentes circunstancias 38 alumnos (21,47%) y completaron la cursada 139. De ese total, aprobaron la asignatura el 55,39% de los cuales 35,95% procedían de colegios con orientaciones biológicas y el 19,42% con otras orientaciones. Hubo diferencias en el porcentaje de alumnos que quedaron en situación de libres, ya que con orientación biológica fue de 18,75%, mientras que sin orientación biológica fue de 28,81%. Con respecto a los alumnos aplazados, los porcentajes fueron: 13,75% con orientación biológica y 15,25% sin orientación biológica en el nivel medio. Estos datos permiten reflexionar sobre la importancia de los conocimientos previos obtenidos en el polimodal para la continuidad de los estudios universitarios. Consideramos que los alumnos con orientaciones biológicas lograron un mejor rendimiento académico en la asignatura Biología General de la carrera medicina veterinaria, que aquellos con cualquier otra orientación recibida en el polimodal.

11. (7865) ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA GLÁNDULA UROPIGIA. GUTIÉRREZ, ANA MARÍA; REBORDO, GUILLERMO R; MONTALTI, DIEGO; SALIBIÁN, ALFREDO (1)

Cát. Fisiología Animal, Fac. Cs. Nat. y Museo, UNLP (1) UN Luján.

La glándula uropigia es la única estructura tegumentaria de secreción externa típica de las aves acerca de la cual en la ac-

tualidad no hay acuerdo en lo referente a sus funciones. El objetivo de este estudio fue determinar la función fisiológica de la glándula uropigia. Hemos observado que en ciertas especies terrestres la glándula esta más desarrollada que en algunas acuáticas. En la paloma casera *Columba livia*, desarrollamos una técnica quirúrgica para remover la glándula lo que permitió demostrar que la ablación de la misma no afecta la sobrevivencia de las aves por lapsos de hasta 60 días. Tres semanas posteriores a la ablación no se observaron cambios de los pesos corporales ni en la alimentación. Tampoco hubo modificaciones en los parámetros bioquímicos básicos asociados al metabolismo lipídico como los niveles en suero de colesterol ($3.8 \pm 0,7$ y $4,1 \pm 0,4$ g/l: controles(con), n=6 vs. ablacionados(ablac) n=4), de lípidos totales ($13,8 \pm 2,4$ y $13,7 \pm 2,7$ g/l: con, n=6 vs. ablac n=6) y de calcio $8,1 \pm 0,4$ y $9,9 \pm 0,9$ g/l. Además se determinó la cantidad de secreción (0,385 mg), el contenido de lípidos totales (38%) y la composición de ácidos grasos de la secreción de la glándula; el ácido graso más abundante fue el C18: 1 (37%). Se realizaron ensayos para evaluar si la glándula esta involucrada en una respuesta defensiva a sustancias erógenas lipofílicas. Se inyectaron palomas con el insecticida lindano por un periodo de 7 días. Los ejemplares control no presentaron trazas del xenobiótico; mientras que los contaminados alcanzaron un contenido de 6,90 µg de lindano por mg de tejido glandular. Estos resultados sugieren que la glándula puede acumular y concentrar contaminantes, cumpliendo funciones de excreción de sustancias tóxicas. Además, podemos afirmar que el rol fisiológico de la glándula no depende de la masa. La secreción de la glándula preserva además la estructura física de las plumas y protege la superficie del cuerpo contra factores ambientales.

BIOLOGÍA GENERAL 2: BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

- 12. (6666) EFECTO DE AGONISTAS DE PPAR ALFA SOBRE LOS NIVELES DE LÍPIDOS EN FETO Y PLACENTA DE RATA A MEDIADOS DE LA GESTA.** MARTINEZ, NORA; JAWERBAUM, ALICIA; CAPOBIANCO, EVANGELINA; WHITE, VERÓNICA; PUSTOVHR, CAROLINA; HIGA, ROMINA; GONZALEZ, ELIDA

CEFYBO - CONICET

Los fibratos son fármacos que modulan el metabolismo lipídico en tejido adiposo a través de la activación del receptor nuclear PPARalfa. Dicho receptor nuclear es esencial para el desarrollo placentario y aunque se desconoce su función se expresa en el feto a partir del día 13 de gesta. El objeto de este estudio es evaluar el posible efecto modulador de LTB4 (agonista endógeno de PPARalfa) y de clofibrato (agonista farmacológico de dicho receptor) sobre los niveles de lípidos placentarios y fetales de rata a mediados de la gesta. Metodología: Los tejidos estudiados se incuban en presencia o ausencia de LTB4 (0.1µM) o clofibrato (20 µM) para luego determinar los niveles de distintas especies lipídicas mediante TLC, revelado y cuantificación por densitometría. Resultados: En el tejido placentario los agonistas endógenos o farmacológicos de PPARalfa no modifican los niveles de triglicéridos, colesterol, ésteres de colesterol y fosfolípidos. En el tejido fetal LTB4 reduce los niveles de triglicéridos (41%, $p < 0.01$) y de ésteres de colesterol (42%, $p < 0.05$), sin modificar los niveles de fosfolípidos y colesterol. Asimismo, en presencia de clofibrato, se observa una disminución en los niveles fetales de triglicéridos (30%, $p < 0.02$) y de ésteres de colesterol (49%, $p < 0.05$), no observándose alteraciones en los niveles de colesterol y fosfolípidos. La activación de PPARalfa no parece modular los niveles de los lípidos evaluados en el tejido placentario. Sin embargo, en el tejido fetal, la activación de este receptor nuclear tanto mediante agonistas endógenos como farmacológicos, regula negativamente los niveles de triglicéridos y de ésteres de colesterol, que cumplen un rol esencial durante el crecimiento y diferenciación de órganos, eventos propios de esta etapa del desarrollo.

- 13. (6795) EFECTOS DEL CADMIO SOBRE EL RIÑÓN DE RATAS GESTANTES.** DIAZ, MARIA DEL CARMEN; VACAREZZA, GRACIELA; QUIROGA, MIGUEL; GONZALEZ, NORMA; NAJLE, ROBERTO

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nac. del Centro de la Pcia. Bs. As.

El Cadmio es un elemento no esencial para los sistemas biológicos, muy tóxico, que se encuentra presente como contaminante en los alimentos, agua o aire. Posee propiedades carcinogénicas y teratogénicas, se absorbe por vía respiratoria, digestiva y dérmica, transportándose unido a hemoglobina, metalotioneína y albúmina. Se acumula con preferencia en hígado y riñón y atraviesa la placenta durante el desarrollo. En el presente trabajo se evaluó, en ratas preñadas, el efecto de la administración subcutánea de Cadmio, sobre la histoarquitectura renal. Paralelamente, se determinó la concentración del microelemento en el tejido de los riñones maternos. Se utilizaron 6 grupos de ratas Wistar gestantes. Los grupos Ia, IIa y IIIa, fueron inyectados con 10mg de Cd /kg de peso corporal, vía subcutánea, los días 7, 9 y 11 de preñez respectivamente. Los grupos Ib, IIb y IIIb controles, recibieron solución fisiológica a los mismos tiempos de preñez. Al día 20 de gestación, las hembras fueron sacrificadas y sus riñones removidos y pesados. En una alícuota del tejido se determinó la concentración de Cd por espectrofotometría de absorción atómica. El resto del órgano se fijó en formol bufferado, para su posterior procesamiento histológico. Cortes de 5 micras se colorearon con H/E y con PAS, para su análisis al microscopio óptico. Las mayores concentraciones de Cd se registraron, en los riñones de ratas inyectadas el día 7 de preñez, observándose diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$). Los resultados de la histopatología muestran: degeneración vacuolar hidrópica, dilatación de los túbulos, precipitado proteico intratubular; necrosis focal con pérdida de núcleos y límites citoplasmáticos. Se concluye que el Cd administrado a determinados días de la gestación, produce lesión renal y una posible alteración funcional, ya que uno de los primeros signos de disfunción renal es el incremento de la excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular

- 14. (6806) DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE FETOS DE 60 DÍAS DE GESTACIÓN DE MYOCASTOR COYPUS (COIPO).** FELIPE, ANTONIO EDUARDO; MASSON, PATRICIA GABRIELA; EYHERAMENDY, VERÓNICA; RODRÍGUEZ, JULIO; ALZOLA, RICARDO

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Grupo de Investigaciones Biológicas, Fac. Cs. Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Bs. Aires, R. Argentina

Los fetos de 60 días de gestación parecen corresponderse, en *Myocastor coypus* (coipo), con un punto de inflexión en el desarrollo de la morfología prenatal. El objetivo de este trabajo fue efectuar la caracterización morfológica (anatómica e histológica) de fetos de 60 días. Para ello se analizaron 7 fetos provenientes de tres camadas, los cuales, luego de un estudio anatómico externo, se procesaron con técnicas histológicas de rutina hasta su inclusión en parafina. En 4 fetos se efectuaron cortes seriados de 5 µm (longitudinales y transversales), que se colorearon con hematoxilina de Mayer y eosina. En los cortes se analizó el estado de desarrollo de los diferentes sistemas orgánicos. El peso medio de los especímenes fue de $1,1 \pm 0,2$ grs, con una longitud céfalo-caudal de $19,9 \pm 0,8$ mm, longitud cefálica de $10,1 \pm 0,4$ mm, un diámetro biparietal de $5,3 \pm 0,6$ mm. Los especímenes mostraron: clara diferenciación de regiones corporales, extremidades y cola, dedos distinguibles con membranas interdigitales; párpados bien definidos y pabellones auriculares en posición lateral. Los órganos tubulares de los sistemas digestivo, respiratorio y excretor presentaron una capa epitelial estratificada recubierta de mesénquima. En el corazón se distinguieron las tabicaciones aurículo-ventricular, interauricular e interventricular. Las gónadas, con aspecto indiferenciado, mos-

traron abundancia de tejido estromático y cordones sexuales dispuestos en la zona perimedular. En el hígado se distinguieron áreas hematopoyéticas amplias. Los pulmones se encontraron en la etapa canalicular. Las observaciones indicarían que, a pesar del reducido tamaño corporal de los especímenes analizados en comparación con estadios posteriores, los mismos presentan un avanzado estado de organogénesis.

15. (6809) HISTOLOGÍA DEL OVARIO FETAL DE MYOCASTOR COYPUS (COIPO). MASSON, PATRICIA GABRIELA; FELIPE, ANTONIO EDUARDO; EYHERAMENDY, VERÓNICA; RODRÍGUEZ, JULIO; ALZOLA, RICARDO

Facultad Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Grupo de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, R. Argentina

La histoarquitectura del ovario adulto de *Myocastor coypus* (coipo) ha sido caracterizada, estableciéndose sus modificaciones durante la madurez sexual. El objetivo de este trabajo fue describir la histología de la gónada del coipo en diferentes etapas del desarrollo fetal. Para ello se utilizaron ovarios de fetos de 60, 90 y 120 días de gestación, que se procesaron hasta su inclusión en parafina, se cortaron longitudinalmente y en serie cada 5 µm y se colorearon con hematoxilina y eosina. Para la clasificación de los folículos se aplicó la tipología específica de *M. coypus*. En los fetos de 60 días la superficie ovárica se presentó festoneada, cubierta por un epitelio de revestimiento simple cúbico. La corteza y la médula no presentaron un límite definido, observándose en la primera abundantes folículos primordiales (tipo II). En los fetos de 90 y 120 días se observó el epitelio de revestimiento simple cúbico o plano, apoyado sobre una túnica albugínea de tejido conectivo laxo. La corteza y la médula mostraron un límite neto. En el área cortical, los folículos se presentaron circundados por un estroma de conectivo de aspecto laxo y muy celular. En el área medular, el conectivo presentó predominio de fibras y la vascularización fue notoria. En ambos tiempos de gestación se observaron folículos primordiales (tipo II) y primarios (tipos IIIa, IIIb y IV). En los ovarios de 120 días de gestación se determinó la existencia de folículos secundarios, con 2 a 4 capas de células granulosas (tipos Va y Vb) y con vacuolas (tipo VI). Las observaciones realizadas indicarían que en el coipo, como en otros animales de laboratorio, el crecimiento y la diferenciación folicular también acontecerían en la etapa fetal.

16. (6874) HISTOGÉNESIS DEL DUODENO DE MYOCASTOR COYPUS (COIPO). EYHERAMENDY, VERÓNICA; FELIPE, ANTONIO; MASSON, PATRICIA; SOLANA, HUGO; RODRIGUEZ, JULIO; ALZOLA, RICARDO

Facultad Ciencias Veterinarias UNICEN. Grupo de Investigaciones Biológicas, Fac. Cs. Veterinarias, UNCPBA, Tandil, R. Argentina

Al presente, son escasos los conocimientos referidos al desarrollo fetal del coipo (*Myocastor coypus*), en particular en los aspectos referidos a su organogénesis. El objetivo de este trabajo fue efectuar la descripción y análisis de la evolución de la estructura histológica de la primera porción del intestino delgado (duodeno) durante diferentes estadios del desarrollo fetal comparándola con la estructura presente en el adulto. Se trabajó con muestras de la primera porción del intestino delgado de adultos y de fetos de 60, 90 y 120 días de gestación. Las muestras se fijaron en solución de Bouin y se procesaron mediante técnicas histológicas corrientes hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes seriados de 5 µm, los cuales se colorearon con hematoxilina y eosina o ácido peryódico de Schiff-hematoxilina (PAS-h). En los fetos de 60 días, se observó la pared del duodeno compuesta por dos túnicas. La interna consistió en un tejido epitelial estratificado de revestimiento, formado por células isodiamétricas. La túnica externa se observó como una gruesa formación de tejido mesenquimático limitada por un epitelio simple plano (mesotelio peritoneal). En el tejido mesenquimático se pudieron diferenciar dos zonas: una capa interna de aspecto laxo

y una externa más densa. En los fetos de 90 y 120 días se observaron vellosidades recubiertas por un epitelio cilíndrico simple, una lámina propia-submucosa de tejido conectivo laxo, dos capas musculares y una serosa. Las células caliciformes (PAS positivas) se observaron a partir del día 120, no visualizándose glándulas duodenales ni capa muscular de la mucosa. El duodeno fetal del coipo presenta un proceso de histogénesis similar al observado en otros roedores de laboratorio, asemejándose su organización tisular a la del adulto.

17. (7188) PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE OVOCITO CAPACES DE UNIR ESPERMATOZOIDES EN BUFO ARENARUM. COUX, GABRIELA; CABADA, MARCELO O.

Area Biología- IBR/CONICET- Facultad de Cs. Bioq. y Farmacéuticas-UNR

En el anfibio *Bufo arenarum*, durante la fecundación, el espermatozoide interacciona con la cubierta gelatinosa del ovocito y luego se une a la cubierta vitelina, donde se dispara la reacción acrosómica. Seguidamente, el espermatozoide reaccionado se aproxima, une y finalmente fusiona con la membrana plasmática del ovocito. Mientras que los detalles de las interacciones moleculares entre el espermatozoide y las cubiertas gelatinosa y vitelina están comenzando a dilucidarse, es poco lo que se sabe sobre las reacciones de unión y fusión de membranas plasmáticas. Nuestro objetivo fue detectar y caracterizar las proteínas de la membrana plasmática del ovocito involucradas en la unión a espermatozoides. Utilizando membranas plasmáticas aisladas provenientes de ovocitos previamente biotinilados superficialmente se realizaron ensayos de incubación con espermatozoides reaccionados. Los espermatozoides fueron centrifugados y lavados exhaustivamente, resuspendidos en buffer muestra y sometidos a SDS-PAGE. Los geles se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa y se detectó la presencia de proteínas biotiniladas mediante el uso de estreptavidina-peroxidasa ('biotin-blot') y revelado con quimioluminiscencia. Se identificó una banda biotinilada, ausente en espermatozoides no incubados con membranas plasmáticas. Esta proteína siguió siendo detectada aún en presencia de 10 mg/ml de albúmina sérica bovina en el medio de incubación. Se estimó un peso molecular de aproximadamente 110 kDa mediante SDS-PAGE. Las membranas plasmáticas de ovocitos también fueron sembradas en una columna con una matriz que tenía acoplado un extracto de proteínas de cabezas de espermatozoides. El análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras, seguido de 'biotin-blot' de las muestras eluidas, mostró la presencia de al menos tres proteínas de aproximadamente 110, 70 y 30 kDa. Estos datos sugieren que estas proteínas estarían involucradas en la interacción ovocito-espermatozoide a nivel de membrana plasmática en *B. arenarum*.

18. (7414) ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRASCRIPCIONAL DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A ÁCIDOS GRASOS INTESTINAL (I-FABP) EN PEZ CEBRA (DANIO RERIO). LISA, MARÍA NATALIA; SCIARA, ANDRÉS; ARRANZ, SILVIA

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (CONICET), Área Biología, FCByF, UNR, Argentina

La proteína de unión a ácidos grasos de intestino (I-FABP) es un polipéptido intracelular que interviene en la absorción de lípidos de la dieta uniéndolos a ácidos grasos de cadena larga. El objetivo de este trabajo es analizar la expresión espacio-temporal de I-FABP de pez cebra. Mediante RT-PCR se observó que la transcripción de *i-fabp* comienza a las 6 horas postfecundación (hpf) en el estadio de placa. Por otra parte se clonó en el plásmido pEGFP-1 un fragmento de 930 pb 5' del inicio de la traducción de dicho gen. Esta construcción se linealizó y se microinyectó en embriones de pez cebra en estadio de una célula. La misma estrategia se empleó con 430 pb 5' del inicio de la traducción. En el primer caso el promotor dirigió el inicio de la expresión de la proteína verde fluorescente a las 6 hpf en la

célula vitelina (tejido extraembrionario de reserva nutritiva) y en el epitelio intestinal a los 5 días postfecundación cuando el vitelo se hubo reabsorbido. En el segundo caso, a las 8,4 hpf se observó fluorescencia no sólo en la célula vitelina sino, a su vez, en células embrionarias. En el promotor de i-fabp de pez cebra se encontraron múltiples sitios putativos de unión al factor de transcripción C/EBP α . Para evaluar el papel de dicho factor se microinyectaron embriones con un anticuerpo contra C/EBP α . Estos individuos mostraron anomalías en la reabsorción del vitelo y en la formación del intestino. I-FABP de pez cebra comienza a transcribirse tempranamente en el desarrollo, antes de la formación del intestino. Análisis de 930 pb del promotor utilizando un gen reportero mostraron que I-FABP no es exclusiva de intestino si no que se expresa en la célula vitelina y podría estar relacionada con la reabsorción del vitelo. El promotor de 430 es suficiente para la expresión en la célula vitelina y luego en el intestino en formación si bien podría carecer de sitios represores. Miembros de la familia de factores de transcripción C/EBP podrían actuar regulando la transcripción de i-fabp.

19. (7519) IMPACTO DE LA HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIOFETAL EN UN MODELO MURINO. CEBRAL, ELISA (1, 2); PAZ, DANTE (1)

Lab. de Biología del Desarrollo-IFIBYNE-CONICET. Laboratorio de Biología del Desarrollo-IFIBYNE (1). CEFYBO (2) CONICET

Las bajas tasas de preñez generalmente son debidas a inadecuada hiperestimulación de la ovulación. Se ha sugerido que la pérdida embrionaria temprana luego de la superovulación es atribuible a elevados niveles de estrógenos, a alteraciones de la viabilidad y calidad ovocitaria y a la hostilidad hormonal del tracto reproductor post-inducción. Sin embargo, no se han evaluado los efectos de la hiperestimulación sobre el desarrollo postimplantatorio ni las concentraciones óptimas gonadotróficas para la obtención de una gestación y desarrollo embrionario normal. El objetivo fue estudiar la tasa y calidad de la preñez y el desarrollo embrionario en días «claves» de la fase postimplantatoria luego de la inyección de PMSG/hCG. Hembras adultas murinas se inyectaron con 0- 2,5- 5 y 10 UI/hembra de PMSG/hCG con intervalo de 46-48 hs. Se sacrificaron a los días: 10 (organogénesis temprana), 13 (fase fetal temprana) o 16 (fase fetal media) (día 1 de preñez: tapón vaginal). El Nro. de sitios de implantación y el Nro. embrionario estuvo elevado al día 10 con 2,5 y 10 UI ($p < 0,05$ y $p < 0,01$) y al día 13 con 10 UI ($p < 0,05$) respecto de 0 UI, mientras que el % de embriones se redujo al día 16 con 10 UI ($p < 0,05$). La mortalidad embrionaria (que ocurre antes que la reabsorción del tejido materno) se produjo desde el día 7 al 13 con 10 UI y desde el día 14 al 16 con 5 UI. El retraso de la diferenciación ocurrió desde el día 7 con 10 UI y desde el día 12 con 5 UI. El % total de embriones anormales aumentó al día 13 con 10 UI ($p < 0,001$). El crecimiento embrionario resultó disminuido con 2,5 y 5 desde el día 13 ($p < 0,01$) y con 10 UI desde el día 10 ($p < 0,05$), hechos coincidentes con la reducción de la vitalidad. En conclusión: la hiperestimulación con concentraciones gonadotróficas medias y altas altera el desarrollo en la etapa fetal temprana mientras que la menor de las concentraciones aumenta el riesgo de anomalías en la etapa fetal media-tardía.

20. (7652) EFECTO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL OVOCITO SOBRE LA UNIÓN Y ACTIVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE DE ANUROS. KRAPF, DARÍO; ARRANZ, SILVIA E.; CABADA, MARCELO O.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (CONICET), Área Biología, FCByF, UNR

La matriz extracelular de ovocitos de *Bufo arenarum* se encuentra constituida por cubierta vitelina (CV) y cubierta gelatinosa (JC). Durante la ovulación, el oviducto secreta factores que se depositan sobre la cubierta vitelina formando las cuatro capas de la cubierta gelatinosa. La incubación de tiras de ovocitos en soluciones de baja salinidad provoca la hidratación de JC a

la vez que promueve la liberación de «factores difusibles». Los espermatozoides no penetran la JC hidratada impidiendo así la fecundación. Ensayos anteriores indicaron que proteínas solubilizadas de la cubierta vitelina tienen propiedades de unión a espermatozoides homólogos en ausencia de factores difusibles. El objetivo de nuestro trabajo es la profundización en la caracterización bioquímica y molecular del reconocimiento y activación del espermatozoide. Se evaluó la capacidad de unión in vitro de espermatozoides a CV aisladas del hemisferio vegetal y animal. Estos ensayos mostraron que sólo la CV animal une espermatozoides. El análisis de los hemisferios de CV mediante SDS/PAGE muestra distinta composición. El hemisferio vegetal presenta una doble banda de 100 kDa bajo condiciones reductoras de electroforesis. Estudios de video microscopía in vivo utilizando ovocitos desprovistos de JC mostraron que los espermatozoides se unen fuertemente a la CV a través de la zona apical de la cabeza. Sin embargo la fecundación no ocurre en ausencia de factores difusibles. Ensayos de microscopía de fluorescencia mostraron además que tanto los factores difusibles como las secreciones de oviducto de distintas regiones son incapaces de inducir directamente la reacción acrosómica. Estos datos sugieren que la fecundación de ovocitos de *Bufo arenarum* estaría dada por un proceso de dos etapas: unión y reacción acrosómica. Sólo la reacción acrosómica depende de un componente de la JC que estaría actuado como cofactor en tanto la unión de espermatozoides a CV ocurre en ausencia de factores difusibles. Sólo la CV del hemisferio animal posee propiedades de unión.

21. (7666) FASES DE EXPRESIÓN DE PAX6 EN LA RETINA Y SU RELACIÓN CON LA DIFERENCIACIÓN DE NEURONAS AMACRINAS Y FOTORRECEPTORAS. GARELLI, ANDRES; POLITI, LUIS

Instituto Nacional De Investigaciones Bioquímicas De Bahía Blanca

El gen pax6 ha sido denominado gen maestro de la morfogénesis del ojo dado que mutaciones en el mismo o su expresión ectópica dan origen a animales sin ojos, o con ojos funcionales en sitios anómalos, respectivamente. Con el objetivo de conocer su patrón de expresión y su función en el desarrollo, investigamos su expresión en el ojo de rata desde el día 12 embrionario (E12) hasta el estadio adulto. Observamos dos olas de expresión temporalmente solapadas. La primera se extendió desde el día E12 hasta el nacimiento y la segunda desde E15 hasta el adulto. Durante la primera fase pax6 se expresó en la retina, cristalino y epitelio pigmentado, concordando con el rol de especificar un destino de pertenencia al futuro ojo. Durante la retinogénesis, pax6 se encontró presente en todas las células progenitoras. También en cultivos de retina, el 70% de los progenitores en mitosis expresó pax6 y nestina, un marcador de células indiferenciadas. Una vez que se hicieron post-mitóticos, los progenitores dejaron de expresar pax6 si se diferenciaban como fotorreceptores, o iniciaron la segunda ola de pax6 si se diferenciaban como neuronas amacrin, horizontales o ganglionares. Experimentos de marcación con BrdU en neuronas amacrin mostraron que la segunda fase comienza luego de la mitosis terminal y es acompañada por la expresión de inhibidores del ciclo celular y asociada a la adquisición de características morfológicas y moleculares de neuronas diferenciadas, incluyendo un aumento en la expresión de NCAM, una molécula de adhesión celular, en el momento en que estas neuronas establecen sus conexiones sinápticas. Estas evidencias sugieren que la primera fase de expresión de pax6 constituye una señal de regionalización del tejido que dará origen al ojo y la segunda está asociada a la diferenciación de determinados fenotipos neuronales, donde podría dirigir la expresión de moléculas de adhesión que participan en la sinaptogénesis.

22. (7992) EL RECEPTOR EPHA3 ESTIMULA EL CRECIMIENTO NEURÍTICO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA. ORTALLI, ANA¹; SCICOLONE, GABRIEL¹; ALVAREZ, GABRIELA¹; CARRI, NÉSTOR²; SÁNCHEZ, VIVIANA¹; PASQUALE, ELENA³; FLORES, VLADIMIR⁴

Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof E De Robertis, FMED, Universidad de Buenos Aires. (1) Instituto E De Robertis, FMED, UBA (2) IMBICE, La Plata. (3) The Burnham Inst, USA (4) U. Favaloro

Las células ganglionares de la retina (CGR) nasal (N) conectan con el tectum óptico (TO) caudal y las temporales (T) contactan con el TO rostral. Los receptores Eph y sus ligandos, las ephrinas, se expresan en gradientes complementarios en la retina y el TO y participan en la guía de las fibras ópticas. Las ephrinasA del TO caudal repelen a los axones T portadores de EphA3. El objetivo es evaluar in vitro el efecto del EphA3 como sustrato sobre el crecimiento neurítico, dado que no se conoce su rol en el TO rostral. Realizamos cultivos de retina (explantos y neuronas disociadas) de embriones de pollo y evaluamos el crecimiento axonal sobre EphA3 (dominio extracelular fusionado con Fc vs Fc). Sobre EphA3: Los axones presentan mayor longitud ($p=0.005$). Una mayor proporción de neuronas T disociadas desarrollan axones ($p=0.013$). En los explantos T se observa una mayor densidad de axones emitidos y de axones mayores de 250 μm de longitud. En los explantos N sólo se aprecia mayor densidad de los axones mayores de 250 μm . Estos efectos dependen de la concentración de EphA3 ($p<0.0001$). Evaluamos la conducta de los conos de crecimiento frente a células 293 transfectadas con EphA3 o con EGFP. La mayoría de los conos se expanden al contactar con células que expresan EphA3 pero no con células controles (N: $p=0.006$ y T: $p=0.048$). La mayoría de los conos N se elongan sobre las células transfectadas con EphA3 y la mayoría de los conos T permanecen adheridos ($p=0.03$). Los resultados muestran que el EphA3 promueve diferencialmente el crecimiento neurítico de las CGR según su origen topográfico, observándose una mayor producción de axones T y una mayor longitud de los N. Esto sugiere que el EphA3 expresado en la retina T podría favorecer la producción de axones y que el EphA3 del TO rostral podría promover la adhesión de los axones T y la elongación de los axones N hacia el TO caudal. Este trabajo se realizó con subsidios de CONICET y UBACYT.

BIOLOGÍA MOLECULAR - GENÉTICA 1

23. (6945) ANÁLISIS DE UN SNP EN EL GEN DEL RECEPTOR β 3 ADRENÉRGICO (AR β 3) EN PACIENTES CON SOBREPESO. PEREZ, MARIA SILVIA; CERRONE, GLORIA EDITH; CAPUTO, MARIELA; LOPEZ, ARIEL PABLO; CUNEO, ALDO(2); TARGOVNIK, HECTOR MANUEL; FRECHTEL, GUSTAVO DANIEL

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A.. (2) Cátedra de Nutrición. Hospital de Clínicas «José de San Martín». UBA

Antecedentes: La obesidad se considera un síndrome multifactorial, causada por la interacción de factores genéticos de predisposición y ambientales desencadenantes. Se postuló que la presencia de diferentes SNPs en múltiples genes candidatos (IRS1, PPAR γ , AR β 3, etc) constituyen las bases genéticas de esta enfermedad poligénica. Dentro de los SNPs, el cambio Trp 64 Arg en el gen AR β 3 ha sido asociado a obesidad central y síndrome de insulinoresistencia. Objetivo: Investigar y comparar la frecuencia de aparición de la mutación Trp64Arg en el AR β 3 en pacientes con sobrepeso (IMC>25kg/m²) con una población normopeso (IMC<25kg/m²). Materiales y métodos: El estudio se realizó en una población de 151 sujetos con sobrepeso y 69 sujetos normales. La mutación se analizó mediante la técnica de PCR/RFLP (enzima BstNI). La significación estadística se calculó con el test de Fisher. Resultados: Se halló una diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias genotípicas (Tabla 1). También la frecuencia alélica resultó estadísticamente significativa siendo en la población con sobrepeso de 13.9% con respecto al 5.8% de la población normal ($p=0,023$).

Genotipo	Pac.Obesos	Controles	p
N/N	111 (73,5%)	61 (88,4%)	0.013
N/M	38 (25,1%)	8 (11,6%)	0.02
M/M	2 (1,3%)	0	Nd

Conclusiones: La presencia de la mutación Trp64Arg en el gen AR β 3 contribuye a la predisposición genética para el desarrollo de obesidad y podría utilizarse como marcador de la misma. Este SNP debe considerarse en el contexto de una enfermedad multifactorial, con interacción entre los factores genéticos de susceptibilidad con los factores ambientales desencadenantes.

24. (6988) ANALISIS MOLECULAR DEL GEN PAX8 EN HIPOTIROIDISMO CONGENITO POR DISEMBRIOGENESIS. ESPERANTE, SEBASTIAN A.; RIVOLTA, CARINA M.; VARELA, VIVIANA; MIRAVALLE, LUCRECIA; HERZOVICH, VIVIANA; IORCANSKY, SONIA; TARGOVNIK, HECTOR M.

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Laboratorio de Pesquisa de Enfermedades Congénitas, Hospital Garrahan, Buenos Aires

El hipotiroidismo congénito tiene una incidencia de 1 en 4.000 nacidos vivos. En el 85% de los pacientes con este cuadro clínico heterogéneo se observa disembrigénesis sin presentar bocio y en el 15% restante, dishormonogénesis con bocio. En algunos pacientes la disembrigénesis está asociada con mutaciones en los genes responsables del desarrollo y el crecimiento de las células tiroideas: PAX8, TTF1, TTF2 y receptor de TSH. El gen PAX8 codifica para un factor de transcripción que participa en la embriogénesis de la glándula tiroidea. En el presente trabajo se realizó la búsqueda de mutaciones en 60 pacientes no relacionados con hipotiroidismo congénito y sin bocio. A partir de ADN genómico purificado de sangre periférica se realizó un rastreo inicial por PCR-SSCP de los exones 1 al 12 del gen PAX8 y se secuenciaron los productos con movilidad alterada. Se identificó en el exón 7 una transición 834 C>T, que corresponde a un cambio T225M, y una transición 859 C>T, sin variación del aminoácido 233L. En el exón 9 se observó una transición 1166 G>A correspondiente a un cambio G336S y en el exón 12 una transición 1477 G>A sin variación del aminoácido 439A. Se realizaron estudios poblacionales por PCR-SSCP confirmando que las mutaciones identificadas no corresponden a polimorfismos. A partir de ARNm purificado de tiroides humana, la secuencia codificante de PAX8 se amplificó por RT-PCR utilizando primers específicos y fue clonada en el vector pcDNA6B en los sitios correspondientes a las enzimas EcoRI y BamHI. Se secuenciaron las 1360 pb del inserto, no observando ninguna variación con respecto a la secuencia de referencia. En conclusión se identificaron cuatro nuevas mutaciones, dos con cambio de aminoácido: T225M y G336S y 2 dos mutaciones silenciosas: 233L y 439A. Se clonó y se secuenció el cDNA del PAX8, el que será utilizado para estudiar la expresión del gen y el efecto de las mutaciones sobre la función de la proteína en su unión al DNA.

25. (7288) TRANSFERENCIA Y EXPRESIÓN DE VEGF MEDIANTE VECTORES NO VIRALES EN ISLOTES PANCREÁTICOS Y HEPATOCITOS HUMANOS. ADRIS, SORAYA; BARBICH, MARIANA; CEBALLOS, CANDELA; ARGIBAY, PABLO

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

Antecedentes: La funcionalidad e injerto del trasplante de células depende de factores, metabólicos, angiogénicos e inmunológicos, los cuales pueden ser manipulados in vivo o ex vivo por medio de la transferencia de genes. Objetivo: Evaluar la expresión de diferentes isoformas de VEGF en cultivos de hepatocitos e islotes pancreáticos. Material y Método: Se amplificaron por PCR las 4 isoformas de VEGF, se purificaron las

bandas correspondientes a las isoformas 121 y 165 y se clonaron en un vector de expresión. Estos genes fueron transferidos por medio de liposomas comerciales a cultivos de hepatocitos e islotes pancreáticos humanos. La expresión de VEGF se determinó mediante ensayos de Elisa. Conjuntamente se analizaron como parámetros funcionales los niveles de albúmina en el caso de los hepatocitos, y de insulina en los islotes pancreáticos. Resultados: Hepatocitos e islotes transfectados con las dos isoformas de VEGF presentaron niveles de proteína significativamente mayores ($p < 0.05$) en comparación con los controles. No se observaron efectos adversos respecto a la funcionalidad de los islotes, expresión de insulina medida por inmunofluorescencia, y de las células hepáticas, niveles de albúmina determinados por inmunoblot. Conclusiones: Estos resultados preliminares abren la posibilidad para la transferencia de genes terapéuticos en tejidos a trasplantar, siendo la revascularización un proceso clave debido a su participación en el establecimiento del injerto. Por otra parte la transferencia de genes no afecta la función y arquitectura celular.

26. (7394) DETECCIÓN DE UNA MUTACIÓN EN EL GEN APC, RELACIONADA CON POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR EN UNA FAMILIA ARGENTINA. GÓMEZ, L.; REAL, S.; PRIETO, I.; MAYORGA, LS; ROQUE, M

Laboratorio de Biología Celular y Molecular. IHEM, Fac. de Cs. Médicas. UNCuyo. Mendoza.

La Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP) se relaciona con mutaciones germinales en el gen tumor supresor «adenomatous polyposis coli» (*apc*). Aunque el espectro mutacional es heterogéneo, más del 90% de las alteraciones resultan en la expresión de proteínas truncas no funcionales. El epitelio colónico en un paciente con FAP es normal al nacimiento, comenzando a desarrollarse cientos de pólipos durante la segunda década de vida. Como es característico de los genes tumor supresores, ambos alelos deben estar alterados para que comience el proceso tumorigénico. El diagnóstico genético en un paciente FAP antes de que ocurra la alteración del segundo alelo, permite una intervención precoz. Nuestro objetivo fue diseñar un método indirecto para realizar un diagnóstico presintomático en una familia con esta enfermedad. Ante la sospecha clínica de una paciente con FAP, se envió a analizar a un centro especializado en Holanda el gen *apc* de su ADN obtenido a partir de sangre periférica. Al hallarse una mutación en uno de sus alelos, se desarrolló en nuestro laboratorio un método basado en PCR mutagénica y posterior corte enzimático para diagnosticar al resto de la familia en nuestro país. Dos hijas y una hermana de la paciente fueron diagnosticadas presintomáticamente. Una hija y la hermana resultaron sanas, y se suspendieron las colonoscopias anuales a las cuales se las sometía por control. En otra de las hijas se halló la mutación, y luego de colonoscopias que revelaron la presencia de decenas de pólipos, fue intervenida quirúrgicamente, gozando de buena salud a la fecha. La metodología indirecta basada en PCR mutagénica diseñada en nuestro laboratorio permitió diagnosticar a integrantes de una familia FAP en nuestro país a bajo costo. Esto posibilitó una intervención precoz en los mutados, y una suspensión de colonoscopias en los sanos.

27. (7461) ANALISIS MOLECULAR DE LOS GENES TIROPEROXIDASA (TPO) Y DUOX2 EN HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO POR DISHORMONOGENESIS Y BLOQUEO DE LA ORGANIFICACION DEL YODO. RIVOLTA, CARINA M.; VARELA, VIVIANA; ESPERANTE, SEBASTIÁN A.; CHIESA, ANA; GRUÑEIRO-PAPENDIECK, LAURA; TARGOVNIK, HECTOR M.

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CEDIE-CONICET, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

El hipotiroidismo congénito tiene una incidencia de 1 en 4.000 nacidos vivos. El 15% de los pacientes con hipotiroidismo congénito presentan bocio asociado con mutaciones en los genes responsables de la biosíntesis de hormonas tiroideas (dishormonogénesis): Tiroglobulina (TG), Tiroperoxidasa (TPO), DUOX2, NIS y Pendrina. En la organificación del yoduro, dos enzimas microsomales la TPO y la DUOX2 (relacionada con la generación de H₂O₂) intervienen en la formación de T₃ y T₄. En el presente trabajo se extendió la búsqueda inicial de nuevas mutaciones en los genes TPO y DUOX2 en 14 pacientes no relacionados con hipotiroidismo congénito con bocio y bloqueo de la organificación. A partir de ADN genómico purificado de sangre periférica se realizó un rastreo inicial por PCR-SSCP de los 17 exones del gen de la TPO y en 17 exones del gen DUOX2, y se secuenciaron los productos con movilidad alterada. Se identificaron, siete mutaciones en el gen de TPO: p.N129fsX208, p.N307T, p.R396fsX472, p.V433M, p.P499L, p.C808R, p.G387R y cuatro mutaciones en el gen DUOX2: p.Q36H, p.G418fsX482, 2840-2 A>C y p.S965fsX994. Cuatro compuestos heterocigotas han sido identificados, dos en el gen de TPO (p.R396fsX472/p.V433M y p.N129fsX208/p.G387R) y dos en el gen DUOX2 (p.Q36H/p.S965fsX994 y 2840-2 A>C/p.G418fsX482) Estudios poblacionales confirmaron que las mutaciones identificadas no corresponden a polimorfismos. En conclusión, se identificaron cinco mutaciones con cambio de aminoácido en el gen de TPO (ex.8, 9 y 14) y una en el de DUOX2 (ex. 2); una delección en el gen de TPO (ex. 5) y dos en el de DUOX2 (ex. 11 y 21); una duplicación en el exón 8 de TPO y un cambio de base en el intrón 19 que afecta la secuencia dadora de splicing en el gen de DUOX2. Estos resultados ponen en evidencia que más de un gen debe ser analizado en los pacientes con hipotiroidismo congénito y bloqueo de la organificación del yodo.

28. (7694) ASOCIACION ENTRE EL GENOTIPO DE CYP3A5 Y LA OBESIDAD EN UNA POBLACION ARGENTINA ADOLESCENTE. FERNÁNDEZ GIANOTTI, T.; GARCÍA, S.I.; STEPPAT, N.; PIROLA, C.J.

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Fac. de Medicina, UBA

Las isoenzimas CYP3A forman la mayor porción de proteínas del citocromo P450 en hígado, y se expresan en distintos órganos. CYP3A son responsables del metabolismo de más del 50% de las drogas en uso y de esteroides endógenos. De las 4 isoenzimas CYP3A, la isoforma CYP3A5 es la que presenta mayor variabilidad de expresión interindividuo. Contiene un polimorfismo SNP g6986A>G. El alelo CYP3A5*1 (g6986A) correlaciona con alta expresión de CYP3A5, mientras que el alelo CYP3A5*3 (g6986G) da por splicing alternativo una proteína trunca, sin función. En población afroamericana adulta existe una asociación entre el SNP y la presión arterial. Dado estos antecedentes, nos interesó estudiar la posible asociación del SNP con algunos de los componentes del síndrome metabólico (hipertensión, obesidad, etc.) en población adolescente. Estudiamos 175 adolescente (15±2 años): 121 normotensos (71 mujeres) y 54 hipertensos (22 mujeres), 17 de los cuales eran obesos (Z-BMI >percentilo 95 por sexo y edad), y con diferencias significativas en HDL-colesterol, triglicéridos e insulinemia. Se dosó cortisol sérico por RIE. La genotipificación del SNP g6986A>G se realizó por PCR-RFLP (Sspl). En normotensos, la frecuencia alélica de CYP3A5*3 fue de 0.888 y en hipertensos de 0.935 (en equilibrio de Hardy Weinberg). No encontramos asociación entre la hipertensión con algún genotipo de CYP3A5 (χ^2 , NS). Si observamos que todos los obesos fueron genotipo CYP3A5*3 homocigota (χ^2 , $p < 0.05$) aunque no se encontró asociación entre el cortisol sérico y la obesidad o algún genotipo de CYP3A5 (t-test, NS). Estos resultados muestran por primera vez, que en una muestra de población adolescente argentina, aproximadamente el 80% presenta el genotipo CYP3A5*3 homocigota, con escasa o nula expresión de CYP3A5 (concorda con otros estudios en población caucásica). La asociación encontrada entre el genotipo de CYP3A5 y la obesidad en adoles-

centes sugiere que la isoenzima podría participar en este componente en el desarrollo del Síndrome Metabólico.

29. (7776) CONSTRUCCIÓN DE UNA SECUENCIA DE ADN CODIFICANTE PARA LA HORMONA TÍMICA TIMULINA. REGGIANI, PAULA (1); RIMOLDI, OMAR (1); HEREÑÚ, CLAUDIA (1); SOSA, YOLANDA (1,2); BROWN, OSCAR (1); PLÉAU, JEAN-MARIE (2); DARDENNE, MIREILLE (2); GOYA, RODOLFO (1,2)

(1) *INIBIOLP-Histología B, Fac. Medicina, UNLP, La Plata.* (2) *UMR-8147, CNRS, Necker, Paris, Francia*

La timulina (FTS), hormona tímica involucrada en la diferenciación intra y extratímica de las células T, ejerce una acción facilitadora sobre la secreción hormonal de la pituitaria anterior y administrada en ratones atímicos restaura ciertas funciones de las células T. No ha sido posible clonar su gen, lo cual obstaculizó la exploración de los mecanismos moleculares que participan en las acciones de la timulina. OBJETIVO: Diseñar y construir una secuencia sintética de ADN codificante para un análogo biológicamente activo para timulina. El oligonucleótido doble hebra sintético codificante para timulina fue insertado en el vector de expresión pCDNA3.1, con el cual se transfectaron dos líneas celulares HEK 293 y BHK. Se obtuvieron sobrenadantes y lisados celulares de ambas líneas con los que se realizó un bioensayo de formación de rosetas para timulina: los lisados poseían niveles de FTS de 1.200 ng/ml en las células HEK 293 y 450 ng/ml en las BHK y sus sobrenadantes poseían 300 y 130 ng/ml respectivamente. Lisados y sobrenadantes de células transfectadas con el plásmido vacío (controles) no mostraron actividad de FTS. La inyección i.p. (50 µl/animal) de los lisados de ambas líneas en ratones timectomizados (FTS sérica no detectable) indujo la aparición de niveles séricos de FTS detectables (150 fg/ml). Contrariamente, los lisados controles no indujeron niveles séricos detectables de FTS. La incubación de lisados de ambas líneas transfectadas con un suero policlonal anti-FTS redujo un 90% la actividad de FTS, un antisuero contra un antígeno irrelevante no causó disminución en la actividad de FTS. CONCLUSIÓN: La actividad biológica detectada en los lisados de células transfectadas con pcDNA3.1-FTS es producida por un factor con identidad inmunológica de timulina. La futura inserción de este oligonucleótido sintético en vectores de expresión apropiados permitirá realizar terapia génica en animales timo-deficientes.

30. (7921) POLIMORFISMO MSP I DE LA APOLIPOPROTEINA A I Y ENFERMEDAD VASCULAR ATROSCLERÓTICA EN ARGENTINA. BAÑARES, V (1, 2); POLISECKI, E (3); PETERSON, G (2); BERG, G (3); DEBEZA, A (2); PIVETTA, O (1); BARENGO, N (5); TAVELLA, J (1, 4)

(1) *CNGEM ANLIS,* (2) *PROPIA UNLP-CIC.* (3) *Servicio H Dig Gen Cátedra Gen Biol Mol UBA,* (4) *CONICET Argentina,* (5) *U Kuopio Fin*

Argentina ocupa el cuarto lugar de América en mortalidad cardiovascular. Factores ambientales y genéticos modulan el metabolismo lipídico. Niveles bajos de HDL (lipoproteínas de alta densidad) en plasma son indicadores de riesgo cardiovascular aumentado. La apolipoproteína AI (APO AI) es el mayor componente proteico de las HDL. Objetivo: investigar la relación entre el polimorfismo para la enzima Msp I en el intrón 3 del gen APO AI y la lesión vascular aterosclerótica en pacientes con indicación de angiografía. Métodos: los genotipos se obtuvieron por PCR, digestión con la enzima de restricción Msp I y electroforesis en gel de agarosa en 386 muestras de ADN, 261 con lesión aterosclerótica (L) y 124 sin lesión (NL) y Colesterol total (CT), HDL y Triglicéridos (TG). El análisis estadístico se realizó con SPSS agrupando los genotipos: M1M1 vs. M1M2 y M2M2. Resultados: como es de esperarse en una muestra de este tipo el CT se asocia con la presencia de lesión (OR: 1.01) y en varones (OR: 2.33). La regresión logística no muestra diferencias significativas de asociación entre el alelo M2 y la lesión aterosclerótica (OR:

1.12; 95% CI 0.52-2.38). Sin embargo el genotipo M2M2 (de baja frecuencia) se observó en mujeres (n=3, 2 NL y 1 L) y varones (n=10), estos últimos todos con lesión. Conclusión: si bien, no observamos una asociación significativa entre el alelo M2 de APO AI y la lesión vascular aterosclerótica, dado que todos los varones homocigotas para el alelo M2 presentan lesión aterosclerótica, no podemos aún descartar este polimorfismo como posible factor de riesgo en varones, el análisis en un mayor número de muestras permitirá llegar a un resultado certero.

31. (7993) ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO MSP1 DEL GEN APOB CON LA ENFERMEDAD CORONARIA. POLISECKI, ELIANA; BERG, GABRIELA (1); BANARES, VIRGINIA (2); AGUILAR, DANIEL (2); PETERSON, GRACIELA (2); WIKINSKI, REGINA (1); TAVELLA, MARCELO (2); CORACH, DANIEL; SCHREIER, LAURA(1)

Servicio de Huellas Digitales Genéticas, Cátedra de Genética y Biología Molecular. (1) *Lab Lipidos y Lipoprot, Bioquim Clínica-ffyB-UBA* (2) *PROPIA-UNLP*

La lipoproteína aterogénica LDL constituye un importante factor de riesgo en la enfermedad coronaria (EC) prematura. La apoproteína B es su principal proteína. Se han descrito varios polimorfismos de sustitución única que se asociarían con EC. Sin embargo, en nuestro país no se estudiaron aún polimorfismos del gen APOB. El objetivo de este trabajo fue investigar la asociación de la frecuencia del polimorfismo RFLP-Msp1 (A3611G) que produce un cambio de aminoácido (GluxArg) con la presencia de lesiones ateroscleróticas, y eventualmente evaluar la exactitud diagnóstica del polimorfismo. Se estudiaron 459 pacientes, ambos sexos, de 33 a 80 años, sometidos a angiografía coronaria como st de referencia, realizada por único observador, para diagnóstico de EC o evaluación prequirúrgica valvular, conformándose 2 subgrupos: con presencia (L) n=307 (edad:59.1±10.2) o ausencia de lesiones ateroscleróticas (NoL) n=152 (edad: 58.9±10.8), sin diferencias significativas en edad. Se determinó en plasma colesterol-LDL, triglicéridos y apo B. Un fragmento amplificado de 479pb fue digerido con la enzima de restricción Msp1 con posterior detección en geles de agarosa 2%. En cada grupo se cuantificó la frecuencia del genotipo con el alelo menos frecuente (GA-AA) y el genotipo homocigota para el alelo común (GG). Se observó que los pacientes L presentaron mayor proporción de GA-AA (41%), con respecto a NoL (33%), p=0.049. El likelihood ratio positivo fue 2.9 indicando una aceptable potencialidad diagnóstica de la detección del alelo A. No se encontró asociación entre los parámetros lipídicos y el genotipo. La frecuencia del alelo A en pacientes con EC fue 21%, superior a las reportadas en EC de otros países (10,2% a 16%). El RFLP-Msp1 se asociaría con EC sumándose al conjunto de factores determinantes de la aterosclerosis

32. (8015) CUANTIFICACION DE LA DELECIÓN COMUN DE 4977PB DEL ADN MITOCONDRIAL. SU RELACION CON ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR ATROSCLERÓTICA. POLISECKI, ELIANA; ARRUVITO, LOURDES(2); BERG, GABRIELA(1); SALA, ANDREA; DE LOS SANTOS, RAUL(2); SCHREIER, LAURA(1); CORACH, DANIEL

Servicio de Huellas Digitales Genéticas, Cátedra de Genética y Biología Molecular. (2) *Dto Bioq Clín-FFyB* (3) *V Cátedra Medicina-Hospital Clínicas UBA*

El ADN mitocondrial (ADNmt) tiene mayor susceptibilidad al daño oxidativo que el ADN nuclear. En estudios previos hemos observado acumulación de la delección común de 4977pb en el ADNmt (4977-ADNmt) en muestras de músculos de fallecidos por muerte súbita en comparación con fallecidos por otras causas, lo cual se asociaría con la elevada incidencia de enfermedad cardiovascular (ECV) entre los primeros. Existen pocos trabajos que demuestren el acúmulo de esta delección en pacientes con ECV, algunas controversias pueden deberse a las metodologías analíticas empleadas. Nos propusimos cuantificar la delección

4977-ADNmt en 14 muestras de músculo estriado obtenido de pacientes sometidos a cirugías programadas, con diagnóstico de ECV (n=7, Fem/Masc:1/6, 38 a 82 años) y libres de ECV (n=7, Fem/Masc:3/4, 31 a 88 años), sin diferencias significativas en edad. No se incorporaron muestras de diabéticos. Se realizaron diluciones del ADN extraído -300 a 25 ng- para amplificar 389 pb que muestra presencia de delección, y 75 a 0,1 ng para amplificar un fragmento de 440 pb del ADNmt total. Se fotografiaron productos de dilución en geles de agarosa y se cuantificó con Image Quant 5.1. A partir del gráfico semilog de disminución de DO de los productos de PCR en función de ng ADN, se calculó regresión lineal y la proporción de ng de 4977-ADNmt con respecto a ADNmt total. Las muestras ECV mostraron mayor acumulación de 4977-ADNmt (mediana: 0.052% rango: 0.036-0.100) que las sin ECV (0.024%, 0.012-0.075), p=0.042. La delección correlacionó con el aumento de la edad r=0.76, p=0.016. El aumento en la acumulación de 4977-ADNmt en ECV podría explicarse por el mayor estrés oxidativo asociado con la enfermedad isquémica. Cuantificar la delección en un mayor número de muestras podría esclarecer mecanismos subyacentes de la enfermedad aterosclerótica.

BIOLOGÍA MOLECULAR - GENÉTICA 2

- 33. (6652) UNA NUEVA MUTACION EN EL EXON 2 DEL GEN DE LA GLUCOKINASA.** LÓPEZ, ARIEL PABLO; CERRONE, GLORIA; CAPUTO, MARIELA; PEREZ, MARIA SILVIA; ALVAREZ, MONICA; TARGOVNIK, HECTOR MANUEL; FRECHTEL, GUSTAVO DANIEL

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

Antecedentes: la Diabetes tipo MODY es un subtipo de Diabetes tipo 2, con herencia autosómica dominante que se caracteriza por su aparición en la edad infante juvenil. A diferencia de la Diabetes tipo 1, los pacientes generalmente no requieren insulina al comienzo de la enfermedad. Existen 6 formas clínicas de las cuales el MODY 2 tiene su causa genética determinada por mutaciones en el gen de la glucocinasa. Objetivos: confirmar en un paciente con fenotipo clínico compatible con MODY 2 la alteración genética causante de la enfermedad mediante técnicas de biología molecular estudiando posibles alteraciones en el gen de la glucocinasa. Material y métodos: a partir de sangre periférica del individuo se purificó el ADN por el método de digestión con CTAB. Se rastreó la posible presencia de mutaciones en alguno de los diez exones del gen de la glucocinasa con la utilización combinada de los métodos de PCR y SSCP y la posterior secuenciación de los fragmentos que presentaron patrones alterados de corrida electroforética. Resultados: se encontró una mutación en el exón número 2 que consiste en una transición que cambia el codón 43 del gen de la glucocinasa de CGC a AGC, en forma heterocigota, lo que produce un cambio de Arg por Ser a nivel de la proteína. Esta mutación, aún no descripta, podría ser la causa de la enfermedad en este individuo. Conclusiones: al ser la Diabetes una enfermedad heterogénea y multifactorial, resulta extremadamente complicado desde el punto de vista clínico el diagnóstico certero de cada subtipo. Establecer la causa genética del MODY es de fundamental importancia ya que de ello depende directamente la terapia que se va a instaurar. El estudio de mutaciones en el gen de la glucocinasa por medio de los métodos de PCR, SSCP y secuenciación, permite realizar una genotipificación específica, en este caso de subtipo MODY 2. De esta manera se puede instituir en el paciente la terapia farmacológica mas adecuada según la alteración genética presente.

- 34. (6985) PEQUEÑAS DELECCIONES E INSERCIONES EN EL GEN DEL FACTOR VIII CAUSALES DE HEMOFILIA A SEVERA: 9 MUTACIONES NO REPORTADAS.**

ROSSETTI, LILIANA; RADIC, PAMELA; LARRIPA, IRENE; DE BRASI, CARLOS

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 (F8) constituye la ruta ideal para la provisión de asesoramiento genético. El objetivo de este trabajo es identificar y analizar los efectos de las mutaciones Ins/Del en familias con HA severa (HAS). Se estudiaron muestras de probandos de 30 familias con HAS y negativas para las grandes inversiones y deleciones de F8. Primero, se amplificaron por PCR las regiones génicas codificantes (35 amplímeros), luego se aplicó la técnica de Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE), con subsecuente secuenciación del segmento señalado. Mediante estudios de predicción bioinformática utilizando el programa nnpredict se analizaron las potenciales consecuencias en la estructura secundaria del F8 mutado en los 2 cambios In-Frame caracterizados. En un total de 65 familias con HAS se detectaron 12 mutaciones específicas de familia, 3 recurrentes y 9 nuevas. Tres correspondieron a pequeñas inserciones (Ins) ninguna de ellas previamente reportada: c.435insTTT (p.D145_K146insF) In-Frame; c.5592insA Frameshift +1 (A-run); y c.3500insA Frameshift +1 (A-run); y 9 resultaron pequeñas deleciones (Del): c.208_211delTTTG Frameshift -4; c.6049delG Frameshift -1; c.2014_2016delTTC (p.F672del) In-Frame ya reportadas; y c.3756delG Frameshift -1; c.6919_6920delGA Frameshift -2; c.5689_5690delCT Frameshift -2; c.4388_4391delCTTT Frameshift -4; c.1409delC Frameshift -1; y c.2490delC Frameshift -1 (No A-run); aún no reportadas. En 4/13 (30%) casos con Ins/Del se detectó anticuerpo inhibidor. Los datos de frecuencia y riesgo relativo de inhibidor asociados a Ins/Del resultan similares a los reportados en la literatura. El estudio bioinformático permitió predecir cambios en la estructura secundaria del F8 que determinarían el fenotipo severo asociado a las Ins/Del In-Frame. El abordaje presentado permite la provisión de información segura y directa para asesoramiento genético en familias con HA severa.

- 35. (7018) CAMBIOS DE FALSO Y NO-SENTIDO DEL GEN DEL FACTOR VIII EN HEMOFILIA A SEVEROS: 6 NUEVAS MUTACIONES.** ROSSETTI, LILIANA; RADIC, PAMELA; LARRIPA, IRENE; DE BRASI, CARLOS

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

La Hemofilia A (HA) es una coagulopatía hereditaria ligada al sexo, originada por defectos en el gen factor VIII (F8). Además de las inversiones y las grandes deleciones causales de la mayoría de las HA severas (HAS), es importante la detección de mutaciones pequeñas, responsables de los restantes defectos moleculares. Los objetivos de este trabajo fueron identificar y analizar las mutaciones missense y nonsense en familias Argentinas con HAS. Se detectó la presencia de pequeñas mutaciones en un grupo de 65 familias con HAS, por la técnica de Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) y se estudiaron mediante esta misma técnica 80 cromosomas X de individuos sanos de la población Argentina. Mediante el programa nnpredict se analizaron los posibles cambios en la estructura secundaria asociada al F8 mutado. En 9 familias se caracterizaron mutaciones puntuales: 4 nonsense, que determinan la terminación prematura de la traducción y el fenotipo severo, 2 reportadas c.6496T>A (p.2166R>X), c.2443C>T (p.815Q>X), y 2 no reportadas, c.6825T>A (p.2275Y>X), c.1656C>A (p.552Y>X); 5 missense que afectaron aminoácidos conservados entre las 4 especies analizadas (humano, porcino, murino y canino), 1 reportada c.6683G>A (p.2228R>Q), y 4 no reportadas, c.6959T>C (p.2320L>S), c.755C>A (p.252T>K), c.6947T>C (p.2316L>P), y c.5881T>A (p.1961W>R). En los 80 cromosomas X normales analizados se confirmó la ausencia de estas mutaciones. Mediante el estudio molecular exhaustivo del F8 se lograron caracter-

zar las mutaciones de cambio de base en 9 familias con HAs, el estudio de la población normal y el análisis bioinformático permitió determinar fehacientemente que las 4 mutaciones missense no reportadas, son causales de las HAs en cada caso. La caracterización de la mutación causal permite el asesoramiento genético de las familias afectadas, y la provisión de información clave para el tratamiento y seguimiento de la enfermedad.

36. (7167) UTILIZACION DE POLIMORFISMOS COMO HERRAMIENTA PARA EL DIAGNOSTICO DIRECTO DE PACIENTES CON RETINOBLASTOMA. FERNANDEZ, CECILIA SOLEDAD; DALAMON, VIVIANA; FERREIRO, VERONICA; GILBERTO, FLORENCIA; SZIJAN, IRENE

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

El retinoblastoma (RB) es un tumor ocular maligno que se desarrolla en niños hasta los 4-5 años (1:20.000). Es el más frecuente de los tumores oculares de la niñez. Se presenta por mutaciones en el gen RB1 (13q14), el 80% de éstas son pequeñas mutaciones y el 20% son grandes rearrreglos. El objetivo del trabajo fue detectar grandes deleciones en el gen RB1 mediante la aplicación de polimorfismos como herramienta molecular. Se analizó el ADN de leucocitos de 4 familias con afectados de RB de diferente presentación fenotípica, a través de los siguientes polimorfismos intragénicos: BamHI-intrón 1, RbI4-intrón 4, XbaI-intrón 17, Rb1.20-intrón 20. La segregación de los alelos polimórficos dentro de cada familia permitió establecer: Paciente 1) hemicigota para Rb1.20 evidenciando una deleción del alelo materno para ese locus; paciente 2) hemicigota para los 4 loci estudiados, deleción del alelo paterno; paciente 3) hemicigota para los 4 loci estudiados, deleción del alelo materno; paciente 4) hemicigota para los loci XbaI y Rb1.20, deleción del alelo paterno para esos loci. La detección de las mutaciones en el ADN de leucocitos de los pacientes demostró su origen germinal y debido a que ninguna familia presentaba antecedentes familiares, se clasificaron los RB como Hereditarios de Novo. Se pudo excluir a los hermanos de los pacientes 1), 2) y 4) de ser portadores de la mutación que predispone a desarrollar la patología, por no presentar la deleción hallada en los pacientes, para cada caso. La hermana del paciente 3) también desarrolló RB y presentó la misma deleción que se identificó en su hermano. Los polimorfismos se utilizan generalmente para estudios indirectos de segregación de alelos polimórficos intrafamilia, se demuestra mediante este trabajo que también pueden convertirse en una herramienta para la identificación de mutaciones en estudios directos.

37. (7267) EVOLUCIÓN CROMOSÓMICA CLONAL EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC). CHENA, CHRISTIAN (1); ARROSSAGARAY, GUILLERMO (2); SLAVUTSKY, IRMA (1)

Deptos de Genética (1) y Clínica Hematológica (2), Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

La LLC se caracteriza por una lenta acumulación de linfocitos B neoplásicos en sangre periférica (SP) y un curso clínico altamente variable. Se considera evolución clonal (EC) a la adquisición de cambios cromosómicos no específicos que acompañan a las anomalías primarias. Datos previos de nuestro grupo muestran un peor pronóstico para la asociación de +12 y deleción 13q14. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de EC en pacientes con LLC y determinar su correlación con la progresión de la enfermedad. Se estudiaron 62 casos (edad media: 65 años, rango: 41-85 años; 32 varones). Se efectuó cultivo de SP con estimulación mitogénica, análisis cromosómico por bandeó G y FISH empleando las siguientes sondas: centrómero de 12 y secuencia única de los genes TP53 (17p13), ATM (11q23) y D13S319 (13q14). Se realizó el análisis molecular de las secuencias promotoras de los genes p15INK4B, p16INK4A y ARF (9p21), mediante la técnica MSP (methylation sensitive PCR), no observándose metilación en ningún paciente. Se ob-

servaron anomalías cromosómicas en 47 casos (76%), +12 en 15 (24%), deleción de TP53 en 9 (15%), deleción de 13q14 en 27 (44%), ATM (16%), detectándose 12 pacientes (19%) con EC. El análisis cromosómico de estos últimos casos permitió observar las siguientes alteraciones participando en EC: +12, deleción 11q23, -14, -15, +22, las traslocaciones t(2;17) y t(2;14), pérdida monoalélica de TP53, ATM y D13S319. El análisis de sobrevivencia libre de eventos (Kaplan-Meier), mostró diferencias significativas para los casos con EC (33 meses) y deleción de TP53 (10 meses) con respecto a los grupos con deleción 13q14 (156 meses) y sin anomalías (92 meses) ($p < 0.005$). Estos datos indican que la inestabilidad genética dentro del mismo clon es frecuente, que la EC estaría asociada a la progresión de la enfermedad y que el comportamiento heterogéneo de la patología podría estar relacionado a estos eventos citogenéticos alternativos

38. (7363) ANÁLISIS DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS SECUNDARIAS (ACS) EN LINFOMA FOLICULAR (LF). SU ASOCIACIÓN CON EL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN NEOPLÁSICA. CERRETINI, ROXANA; NORIEGA, M FERNANDA (1); NARBAITZ, MARINA (3); SLAVUTSKY, IRMA (1)

Dpto de Genética (1), Acad Nac de Medicina, Centro Nac de Genética Médica (2), Dpto de Patología (3), Academia Nacional de Medicina.

El Linfoma Folicular es una neoplasia indolente de células B del centro folicular, constituyendo la forma más común de los linfomas no-Hodgkin del adulto (35%-40%). El 25-35% de los casos progresa a Linfoma B Difuso de Células grandes (LBDCG-S). El objetivo de este trabajo fue evaluar la frecuencia y distribución de ACS en pacientes con LF y LBDCG-S y establecer su participación en los mecanismos de progresión tumoral. Se efectuó cultivo de corto término (24-48 hs) de médula ósea y/o biopsia ganglionar, análisis citogenético con bandeó G complementado con hibridación in situ con fluorescencia y estudio molecular del gen BCL-2 por PCR. Se evaluaron 39 pacientes con diagnóstico de LF y 12 con LBDCG-S, observándose rearrreglos genómicos en el 79,5% y 91,7% de los casos, respectivamente. La t(14;18)(q32;q21) fue la alteración más frecuentemente observada: 83,3% en LF y 58% en LBDCG-S. En ambos casos, la mayoría (85,7% y 81,8%, respectivamente) de las ACS fueron desbalanceadas, con pérdidas parciales de material genético. Los cromosomas 1 y 3 en LF y los cromosomas 6, 9 y 12 en LBDCG, fueron los más frecuentemente involucrados en anomalías estructurales secundarias (AES). En LF, se observaron 10 AES no descriptas y se detectaron 4 ACS recurrentes: t(3;14)(q27;q32), dup(1)(q21q32), del(6)(q21) y trisomía 21. En LBDCG-S se detectaron 7 AES no publicadas en la literatura. La del(6)(q21) fue una AES recurrente. El 41,7% de los pacientes con transformación morfológica de su enfermedad presentaron AE con pérdida de material del cromosoma 6. Nuestros resultados mostraron un alto nivel de inestabilidad cariotípica sugiriendo que la desregularización de diferentes caminos genéticos serían requeridos para alcanzar el potencial neoplásico completo, y la transformación morfológica del LF, sustentando una asociación entre deleciones de 6q21-qter y el proceso de transformación tumoral.

39. (7760) DESARROLLO DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE PARA SER UTILIZADO COMO HERRAMIENTA PARA DETECTAR MUTACIONES TRUNCANTES. REAL, SEBASTIÁN; GÓMEZ, LAURA; MAYORGA, LUIS; ROQUE, MARÍA

Lab. de Biología Celular y Molecular, IHEM (CONICET-UNCuyo), Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo

Un sistema doble híbrido bacteriano se basa en la complementación funcional de dos fragmentos de una enzima, la cuál produce un segundo mensajero necesario para la transcripción de ciertos genes, como el reportero β -Galactosidasa. Estos fragmentos al ser expresados por separado son no fun-

cionales. Sin embargo, si son fusionados sus cDNA en un vector, esta unión resulta también en una enzima activa y por lo tanto en la expresión de genes. Nuestra hipótesis es que insertando una secuencia de ADN entre ambos fragmentos, la presencia de un codón «stop» en esta, daría un solo fragmento no funcional; y en caso de ocurrir un evento de re-iniciación río abajo del codón «stop», se obtendrían dos fragmentos, pero separados y por lo tanto tampoco funcionales. Al transformar bacterias carentes de esta enzima, se podría medir la presencia de un codón stop en la secuencia insertada por la expresión del gen reportero β -Gal. Nuestro objetivo fue diseñar y desarrollar este plásmido recombinante, y confirmar su reconstitución funcional a través de la observación de distintos fenotipos del reportero β -Gal. Para esto se insertó uno de los fragmentos del gen de la enzima (se evita mencionar la enzima por posible patentamiento del método), en marco de lectura y separado por un MCS, dentro del plásmido que contenía el otro fragmento de la enzima, y posteriormente se transformaron bacterias carentes de esta enzima endógena. Se obtuvieron colonias de color azul (en presencia de X-Gal) en las bacterias transformadas, mientras que las células control (sin transformar) fueron de color blanco. Concluimos que el plásmido diseñado es funcional y revierte el fenotipo de las bacterias, y de esta manera se plantea su posible uso como herramienta para diagnóstico de mutaciones truncantes.

40. (7771) VARIACIÓN Y MUTACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES DE CROMOSOMA Y EN UNA MUESTRA CAUCASOIDE. CATANESI, CECILIA INÉS; DI ROCCO, FLORENCIA; SILBESTRO, MIRIAM; VIDAL RIOJA, LIDIA

Lab. de Genética Molecular - IMBICE. Área temática secundaria: Otros: Genética de poblaciones humanas

Los microsátélites ubicados en la región no recombinante del cromosoma Y (Y-STRs) son de herencia exclusivamente paterna y se transmiten en bloque a través de un linaje masculino. Son de utilidad para estudios de paternidad e identificación de material genético masculino en muestras forenses mezcladas con material femenino. Sin embargo, para la correcta resolución de casos es importante conocer las frecuencias haplotípicas regionales y la tasa mutacional de los Y-STRs. El presente es un aporte a dicho conocimiento en varones caucasoideos de Argentina. Los microsátélites DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385a/b, DYS437 y DYS438 fueron tipificados por PCR y electroforesis en geles de poliácridamida en individuos pertenecientes a 35 familias. Para el análisis de la tasa mutacional de estos Y-STRs se analizaron 500 eventos meióticos en duplas padre-hijo, de vínculo biológico comprobado (edad paterna promedio=32,94). Se hallaron 34 haplotipos diferentes, siendo el más frecuente ($p=0,05714 \pm 0,040$): DYS19-14; DYS389I-13; DYS389II-29; DYS390-24; DYS391-10; DYS392-13; DYS393-13; DYS385-11/14; DYS437-15; DYS438-12. La diversidad génica fue de $0,6273 \pm 0,3426$. Se detectaron dos mutaciones (una en DYS391 y una en DYS385). El conjunto de marcadores DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 y DYS385a/b es llamado comúnmente «haplotipo mínimo». Datos previos de tasa mutacional (μ) de estos marcadores indicaron un total de 18 mutaciones en 8659 eventos meióticos, los cuales sumados al presente resultado indicarían un valor de $\mu=0,0020$. Hasta el momento no existen estimaciones de μ para los Y-STRs DYS437 y DYS438, siendo necesario el análisis de un mayor número de eventos meióticos. Estos datos preliminares son de utilidad para obtener un valor de μ fidedigno. Esto redundará en una mejor estimación de probabilidades en casos de paternidad que presenten mutaciones.

41. (7926) AUSENCIA DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS. VÁZQUEZ, MARIA LORENA (1,2); DE DIOS SOLER, MARCELA (1); TACCHI, CECILIA (2); VENICA, ANDREA (2); ALBERBIDE, JORGE (2); NUCIFORA, ELSA (2); LARRIPA, IRENE (1); FUNDIA, ARIELA (1)

Depto. de Genética, Academia Nacional de Medicina; Lab. Central, Hospital Italiano. (1) Academia Nacional de Medicina; (2) Hospital Italiano

El desarrollo de los síndromes mielodisplásicos (SMD) es un proceso gradual en múltiples etapas que llevan a la expansión leucémica del clon maligno. En la fase inicial habría lesiones iniciadoras citogenéticamente indetectables originando inestabilidad genómica que induciría cambios cromosómicos críticos. A fin de establecer si las SMD presentan inestabilidad de microsatélites (MSI) se estudiaron 10 pacientes al diagnóstico o tratados con ácido fólico, vitamina B12 o eritropoyetina. Para evaluar la MSI en las células malignas respecto de las células normales, se separaron las células mononucleares de médula ósea por Ficoll-Hypaque y se incubaron 1 hora a 37°C obteniéndose las células no adheridas enriquecidas en stem cell CD34+. Se extrajo ADN de las células no adheridas (ADN tumoral) y de polimorfonucleares (ADN normal) con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Se seleccionaron 3 microsátélites: BAT 25, BAT 26 y D18S58 recomendados como panel de referencia de MSI. La amplificación se efectuó por PCR touchdown con disminución de la temperatura de annealing de 65 a 55°C en 25 μ l con 1,0mM Cl2Mg, 100 μ M dNTPs, 0,4-0,8 μ M primers, 1U de Taq polimerasa y 200ng de ADN. Los productos se separaron por electroforesis en geles de poliácridamida no desnaturizantes teñidos con nitrato de plata (0,1%). El tamaño de los alelos observados para BAT 25 y 26 mostró una variación alélica de -2 a +1 pb en los pacientes estudiados, no observándose diferencias entre tejido normal y tumoral. Con el microsátélite D18S58, un caso presentó una amplificación de un alelo en el ADN de las células no adheridas respecto del alelo constitutivo observado en el ADN normal. Estos resultados demuestran que ninguno de los pacientes con SMD presenta alteraciones en los microsátélites analizados, sugiriendo que la MSI no tendría un rol importante en la patogénesis de los SMD.

42. (7958) ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE MTHFR CON TOXICIDAD AL METOTREXATO (MTX) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA). ESTUDIO PRELIMINAR. ARÁOZ, VERÓNICA (1); FELICE, MARÍA (2); D'ALOÍ, KARINA (2); ALFARO, ELIZABETH (2); CHERTKOFF, LILIE (1)

(1) Biología Molecular-Genética. Hospital Garrahan. (2) Servicio de Hemato-oncología. Hospital Garrahan

La enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) cumple un rol esencial en el metabolismo del folato. Diferencias en su actividad debido a variantes genéticas como C677T y A1298C pueden modular la respuesta a agentes quimioterápicos antifolato. De ellos, el MTX es el más usado en el tratamiento de LLA. El objetivo de este estudio es evaluar si existe asociación entre la presencia de los polimorfismos C677T o A1298C y la toxicidad en niños con LLA que reciben altas dosis de MTX. Se estudiaron 101 pacientes con LLA sometidos a esquemas de tratamiento que incluyen 4 ciclos de 2 ó 5 gr/m²/día de MTX. Se analizó un total de 247 ciclos en los 65 niños que completaron el tratamiento con MTX. Se evaluó toxicidad hematológica, renal, hepática, gastrointestinal, de mucosa, infecciosa, cardíaca y neurológica. La toxicidad se definió en 5 grados según OMS. Considerando la dosis de MTX los pacientes se estratificaron en dos grupos: A) 2gr y B) 5gr. La búsqueda de las variantes C677T y A1298C se realizó por PCR y posterior corte con enzimas de restricción. La asociación entre genotipos y toxicidad se analizó con tablas de contingencia y test de Fisher. En los niños con LLA la frecuencia genotípica encontrada fue: 51.5%CC, 37.4%CT, 13.1%TT para C677T y 4%CC, 39.4%AC y 58.6%AA para A1298C. En el grupo A se observó asociación significativa del alelo T con la presencia de fiebre ($p=0.029$) y estomatitis ($p=0.003$). Por otro lado, los niños que presentaron toxicidad neurológica tuvieron al menos un alelo T. En el grupo B, no se observó asociación significativa entre genotipo y toxicidad. El polimorfismo A1298C no presentó asociación con las variables consideradas. En la serie analizada el alelo T sería un alelo de

susceptibilidad para la presencia de estomatitis y fiebre, aunque no parece predecir el grado de severidad. Estos resultados, si bien preliminares, son similares a los encontrados en otros grupos con LLA.

43. (8025) PORFIRIA VARIEGATA EN LA POBLACIÓN ARGENTINA. ESTUDIOS GENÉTICOS. FERREIRA GOMES, MARIELA SOLEDAD; PARERA, VICTORIA ESTELA; BATLLE, ALCIRA; ROSSETTI, MARIA VICTORIA

Departamento de Química Biológica-FCEN-UBA. CIPYP-CONICET

La Porfiria Variegata (PV) es una enfermedad metabólica autosómica dominante que surge como consecuencia de una deficiencia parcial en la Protoporfirinógeno oxidasa (PPOX), enzima que cataliza la oxidación del Protoporfirinógeno IX en Protoporfirina IX en la biosíntesis del Hemo. Hasta el momento se han descrito 120 mutaciones diferentes en el gen que codifica para la PPOX responsables de PV. La mayor prevalencia se encuentra en la población blanca sudafricana (1:300), siendo la mutación más frecuente la R59W debido a un efecto fundador. En Europa la mayor frecuencia se encuentra en Finlandia (2:100.000) donde se han descrito 3 mutaciones en más de una familia (I12T, 338G-C y R152C). En nuestro país la frecuencia es de 1:600.000. Hemos diagnosticado bioquímicamente como PV 50 familias, de las cuales 8 ya han sido estudiadas a nivel molecular habiéndose detectado 5 mutaciones nuevas: 3 puntuales (R168H, H106P, L178V), una inserción (1320insT) y una mutación de splicing (IVS 7-1 G-A). En esta oportunidad presentamos los resultados en otras 7 familias PV. Mediante amplificación por PCR y secuenciación manual se detectaron 2 mutaciones nuevas de splicing: IVS7-1G-C y IVS5-1G-A, que producirían la delección de los exones 5 y 8 respectivamente. De las 5 familias restantes 2 presentan la mutación insT1320, ya encontrada en 3 casos, con lo que el número de familias aparentemente no relacionadas que portan esta mutación aumenta a 5. Los resultados refuerzan nuestra hipótesis de que, a pesar del escaso número de familias estudiadas, la insT1320 sería la mutación más frecuente en la población argentina (35%). Si bien el análisis comparativo de los datos bioquímicos, sintomatología y la mutación presente en estos pacientes no permiten establecer, por el momento, una clara relación genotipo/fenotipo, la identificación de la mutación responsable de la PV en cada familia permite la detección de portadores asintomáticos y su asesoramiento para evitar el contacto con los agentes desencadenantes de la porfiria.

BIOLOGÍA MOLECULAR 1: RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN 1

44. (7052) SUBCLONADO Y EXPRESIÓN DE LA ENZIMA UROD WT HUMANA, Y MUTANTES QUE ALTERAN SU INTERFASE DE DIMERIZACIÓN. GRAZIANO, MARTÍN; CARCAGNO, ABEL L.; RÍOS DE MOLINA, M. C.

Dpto. de Química Biológica, FCEyN, UBA

La Uroporfirinógeno decarboxilasa (UroD) es la quinta enzima de la biosíntesis del hemo. Se encuentra como homodímero en solución, pero aun se desconoce la importancia de la dimerización para su función. El objetivo de este trabajo es subclonar y expresar la UroD humana tanto salvaje (wt), como mutantes con una alteración en la interfase de dimerización. Aplicamos un nuevo método para la selección de las mutantes a diseñar basado en el cálculo de la energía de interacción entre complejos proteína-proteína y del efecto de mutaciones sobre la estabilidad de dicho complejo, utilizando para ello el programa Fold-X diseñado por Serrano y col. Comprobamos que sólo una de las 34 mutaciones puntuales clínicas (en pacientes con porfiria cutánea tarda) detectadas hasta el momento (Y311C) provoca una significativa disminución en la energía libre de unión de las subunidades, con una variación, respecto de la wt, de 1,02

$\pm 0,33$ Kcal/mol y $2,72 \pm 0,33$ Kcal/mol para el heterodímero y el homodímero respectivamente. En tanto que la mutación Q183F es una de las pocas mutantes que no afecta la estabilidad del monómero pero sí afecta significativamente la del dímero ($3,97 \pm 0,33$ Kcal/mol). Para expresar la enzima wt se subclonó el cDNA de humanos en el plásmido de expresión pRSET. Las mutantes se generaron por mutagénesis dirigida por PCR (método overlap extension) y se confirmó su marco de lectura abierto mediante secuenciación automática de los clones. Se expresó en *E. coli* BL21pLys la UroD wt, las mutantes simples y la doble mutante Y311C,Q183F y se purificaron mediante una columna de afinidad hacia poliHis. La purificación se siguió midiendo la actividad UroD y por SDS-PAGE, detectando dos bandas, a 45 ± 2 kDa y 89 ± 4 kDa. Se realizó una curva de inducción con IPTG 1mM de la UroD wt, determinando un tiempo óptimo de inducción de 4 hs. Hemos logrado diseñar y expresar la UroD wt y mutantes que alteran su interfase de dimerización, como paso previo para el estudio de la relación estructura-función de la misma.

45. (7237) PÉPTIDOS QUIMÉRICOS DEL INTERFERÓN-A2B COMO AGONISTAS PARCIALES DE LA ACCIÓN ANTI-PROLIFERATIVA DE LA CITOQUINA. BLANK, VIVIANA; PEÑA, CLARA; MARINO, JULIETA; ROGUIN, LEONOR

IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires, Argentina

En la búsqueda de dominios que simulen la región del interferón-a2b (IFN-a2b) que se une a sus receptores, previamente sintetizamos dos derivados de la citoquina: un péptido lineal de 28 aminoácidos y otro cíclico obtenido por reacción de los extremos N- y C-terminales del fragmento lineal. En el presente trabajo, evaluamos las propiedades biológicas de ambas quimeras en una línea de células que expresa receptores específicos para IFN-a2b (WISH). Luego de incubar las células durante 72 horas en presencia de los derivados sintéticos, observamos que la proliferación celular disminuyó en forma dependiente de la concentración de péptido agregado, alcanzando valores de inhibición máximos de $30 \pm 10\%$ y $40 \pm 6\%$ para $20 \mu\text{g/ml}$ del fragmento lineal o cíclico, respectivamente. Por ensayos de citometría de flujo demostramos que, en las mismas condiciones experimentales, se obtuvo un incremento moderado del porcentaje de células hipodiploides (3% control, 19% IFN-a2b, 9-11% péptidos). Además, los dos péptidos ($20 \mu\text{g/ml}$) inhibieron significativamente la unión del $(125)\text{I}$ -IFN-a2b a sus receptores ($51 \pm 11\%$ de inhibición para el fragmento lineal y $73 \pm 3\%$ para el cíclico). Los resultados obtenidos indicaron que los péptidos quiméricos se comportan como agonistas parciales del IFN-a2b, desencadenando un efecto antimitogénico probablemente relacionado con la inducción de apoptosis. Aunque ambos derivados mimetizan el epítopo conformacional de la citoquina que interactúa con sus receptores, es posible que otros dominios de la molécula sean necesarios para activar una respuesta biológica máxima.

46. (7377) INGENIERÍA DE LA ENZIMA LUMAZINA SINTETASA DE BRUCELLA SPP. (BLS) PARA LA OBTENCIÓN DE INMUNÓGENOS QUIMÉRICOS POLIVALENTES. AINCIART, NATALIA; ZYLBERMAN, VANESA; CRAIG, PATRICIO; GOLDBAUM, FERNANDO ALBERTO

Fundación Instituto Leloir

BLS es una proteína decamérica de 180 kDa, altamente inmunogénica y termodinámicamente muy estable. Se puede utilizar a BLS como proteína carrier reemplazando los 10 aa de su extremo amino terminal por diferentes péptidos foráneos. La incubación de BLS en 2M GuHCl da lugar a intermediarios pentaméricos plegados y el incremento de agente desnaturante genera monómeros desplegados. Por medio de estos dos equilibrios reversibles, y mezclando dos quimeras diferentes (conteniendo los péptidos OMP31 y KETc1), pudimos producir quimeras polivalentes o mixtas con 2 péptidos foráneos distintos en

una misma estructura proteica. Las quimeras mixtas BLS-OMP31-KETc1 fueron purificadas por columna de intercambio iónico y analizadas por SDS-PAGE e IEF. Seis ratones Balb/c inmunizados con 40µg de la quimera desarrollaron alta reactividad en ensayos de ELISA, DOPromedio: BLS=1,370,24, OMP31=2,2870,14, KETc1=0,9570,14, contra los respectivos antígenos. Generamos también quimeras mixtas W22F-BLS-OMP31 (W22F es una mutante de BLS donde el único residuo de Trp fue reemplazado por uno de Phe, y que tiene diferente coeficiente de extinción molar) para poder analizar quimeras que contengan distintos números de copias del péptido OMP31 (0-2, 4-6, y 8-10) en su estructura decamérica. Además medimos la fluorescencia intrínseca del trp de esta quimera mixta obtenida por disociación y reasociación de los pentámeros y de las proteínas quiméricas por separado. (Emisión a 350nm: W22F=1,4, W22F-BLS-OMP31=3,6, BLS-OMP31=7,22). Las quimeras mixtas son capaces de desarrollar anticuerpos contra el carrier y contra dos péptidos foráneos simultáneamente. Este sistema experimental nos permitirá establecer un modelo que relacione densidad de epitopes con inmunogenicidad, estudiando la relación entre la repetitividad del epítopo OMP31 con la respuesta inmune contra este péptido generada por las distintas quimeras.

47. (7380) ESTUDIO DE LA FUNCIÓN BIOQUÍMICA Y LA EXPRESIÓN EMBRIONARIA DE LA PROTEÍNA CELULAR DE UNIÓN A ÁCIDOS NUCLEICOS CNBP. ARMAS, PABLO; CALCATERRA, NORA B.

IBR, CONICET. Fac. de Cs. Bioq. y Farm., UNR, Suipacha 531, (S2002LRK). Rosario, Argentina.

Introducción: La proteína celular de unión a ácidos nucleicos CNBP ha sido identificada como un factor celular de interacción con ácidos nucleicos de simple hebra. Se la ha relacionado con diversos mecanismos de regulación de la expresión génica que abarcan desde la transcripción hasta la traducción. Objetivos: En este trabajo se propuso identificar y caracterizar la actividad bioquímica de CNBP y analizar su expresión y distribución en embriones durante las primeras etapas de su desarrollo. Resultados: La inmunolocalización de CNBP en embriones del anfibio *Bufo arenarum* y del pez cebra *Danio rerio* muestra señal citoplasmática en los primeros estadios del desarrollo, y señal nuclear en estadios posteriores al de gástrula. A partir de ese mismo estadio se observó una disminución de la unión de factores de extractos embrionarios a las sondas blanco de CNBP. Se analizó por ensayos de retardo en geles la capacidad de interacción de CNBP de *Bufo arenarum* (bCNBP) y formas mutantes, con sondas de ácidos nucleicos de simple hebra para establecer los motivos proteicos involucrados en la unión. Las versiones mutantes que carecen del motivo rico en arginina y glicina (RGG) presente en la estructura primaria de bCNBP no presentaron unión con sondas blanco de ARN, pero sí con las de ADN. Se determinó la actividad de chaperona de ácidos nucleicos de bCNBP por ensayos de hibridación de oligonucleótidos en geles. bCNBP mostró una actividad significativa como aceleradora de la hibridación, mientras que las versiones mutantes sin el dominio RGG muestran menores velocidades de hibridación que los controles. Conclusiones: CNBP muestra un cambio de localización subcelular del citoplasma al núcleo de las células embrionarias de *Bufo arenarum* y *Danio rerio* después del estadio de gástrula. Además, es capaz de interactuar con sondas de ARN y ADN de simple hebra y de catalizar la hibridación de oligonucleótidos complementarios, siendo el motivo RGG esencial para estas actividades.

48. (7724) LA HORQUILLA β DE MICROCINA J25, IMPORTANTE PARA EL TRANSPORTE DEL ANTIBIÓTICO, NO ESTARÍA INVOLUCRADA EN LA INHIBICIÓN DE LA RNAPOLIMERASA Y DEL CONSUMO DE OXÍGENO. BELLOMIO, AUGUSTO; VINCENT, PAULA A.; F. DE ARCURI, BEATRIZ; SALOMÓN, RAÚL A.; FARIAS, RICARDO N.; MORERO, ROBERTO D.

Departamento Bioquímica de la Nutrición, INSIBIO, (CONICET/UNT). Chacabuco 461. S. M. de Tucumán

La estructura de microcina J25 (MccJ25) [G(1)-G-A-G-H(5)-V-P-E-Y-F(10)-V-G-I-G-T(15)-P-I-S-F-Y(20)-G], presenta una unión lactámica entre el grupo alfa-amino de Gly1 y el carboxilo-gama de Glu8, formando un anillo de 8 residuos (Gly1-Glu8). El resto de la cadena (Tyr9-Gly21) atraviesa el anillo quedando atrapado estéricamente por los residuos aromáticos Phe19 y Tyr20. Mediante tratamiento con termolisina se obtuvo un derivado (MccJ25-Th19) de dos cadenas: la A (Gly1-Phe10) y la B (Ile13-Gly21) que aún permanece atrapada dentro del anillo. MccJ25 ingresa al citoplasma de *Escherichia coli* luego de atravesar las membranas externa e interna a través de los receptores específicos FhuA y SbmA respectivamente. Su blanco de acción es la RNA polimerasa (RNAP) en *E. coli* y en *Salmonella newport* actúa además sobre la membrana celular inhibiendo el consumo de oxígeno. MccJ25-Th19 fue capaz de inhibir «in vitro» a la RNAP, pero no afectó el crecimiento de varias cepas de *E. coli*. Sin embargo, MccJ25-Th19 inhibió el crecimiento y la síntesis de RNA «in vivo» de las cepas de *E. coli* MC4100 y AB259 transformadas con plásmidos con fhuA o SbmA clonados. MccJ25-Th19 conserva actividad antimicrobiana disminuida y la capacidad de inhibir la respiración «in vivo» en cepas de salmonella. Estos resultados indican que la estructura de la orquilla-β afectada por el tratamiento con termolisina: a) es muy importante para el transporte del péptido al interior de la célula y b) no influye en la inhibición de la RNAP ni en la inhibición del consumo de oxígeno. Por lo tanto la región del anillo con el extremo C-terminal enhebrado, cuya estructura se conserva intacta en MccJ25-Th19, tendría un rol importante en los efectos inhibitorios inherentes a la actividad antimicrobiana de MccJ25.

49. (7869) MODIFICACIONES DENTRO DEL PRIMER ASA CITOSOLICO DE LA BOMBA DE CA2+ DE MEMBRANA PLASMÁTICA PRODUCEN UN AUMENTO DE LA AFINIDAD APARENTE DE LA ENZIMA POR EL CALCIO. DE TEZANOS PINTO, FELICITAS; ADAMO, HUGO P.

IQUIFIB-Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Fac. de Farmacia y Bioquímica (UBA-CONICET)

El transportador de Ca²⁺ de membrana plasmática, bomba de Ca²⁺ o PMCA, es una proteína integral de membrana de alrededor de 134 kDa y pertenece al grupo P de ATPasas transportadoras de iones. En humanos se conocen cuatro genes que codifican distintas isoformas de la PMCA. El número de variantes de cada isoforma aumenta por el procesamiento alternativo de mRNA. Recientemente mostramos que la eliminación de la secuencia comprendida entre los aminoácidos 296 y 349 en el primer asa citosólica de la isoforma humana 4x de la PMCA (hPMCA4x) produce un aumento de la afinidad por el Ca²⁺ (de Tezanos Pinto, F., Adamo H.P., (2002) *J. Biol. Chem.* 277:12784-12789). Esta región de la molécula está involucrada en la generación de variantes de la PMCA por el procesamiento alternativo del mRNA (splicing site «A») que en la hPMCA4 conlleva la inclusión (isoforma x), o exclusión (isoforma z) de un pequeño exón de 36 nucleótidos. Las consecuencias funcionales de estas variaciones aún se desconocen. Mediante mutagénesis dirigida hemos generado una PMCA similar a la forma natural 4z (~h4z) por la eliminación de los aminoácidos 300 al 314 de la isoforma h4x. La proteína recombinante se expresó en forma estable en células CHO. Medidas del transporte de Ca²⁺ en vesículas de membrana mostraron que la velocidad máxima de h4x y ~h4z es similar. Sin embargo la afinidad aparente por Ca²⁺ fue de 1.83 ± 0.52 µM para h4x y de 0.74 ± 0.22 µM para ~h4z. Los resultados muestran que la delección 300-314 aumentó la afinidad aparente de la enzima por el Ca²⁺ y abren la posibilidad de que el procesamiento alternativo en el sitio «A» genere formas de PMCA con diferente afinidad por Ca²⁺.

50. (7902) IMPORTANCIA DE LA ASPARAGINA 879 EN LA FORMACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN PARA EL CA2+ DEL TRANSPORTADOR DE CALCIO DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS HUMANAS. RINALDI, DÉBORA E.; ADAMO, HUGO P.

*IQUIFIB-Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas,
Fac. de Farmacia y Bioquímica (UBA-CONICET)*

El transportador de Ca^{2+} de membrana plasmática o PMCA es responsable de la expulsión del Ca^{2+} con alta afinidad desde el citosol de células eucariotas al medio extracelular. Es una ATPasa del grupo P que comprende las ATPasas transportadoras de iones que forman una fosfoenzima mediante la unión covalente con el fosfato- γ del ATP. Estudios previos sugieren que en la PMCA, en analogía con la SERCA o Ca^{2+} ATPasa del retículo endoplásmico, la asparagina 879 en el segmento transmembránico 6, es uno de los residuos que forman el sitio de unión del Ca^{2+} . Con el objetivo de establecer la importancia de la asparagina 879 en la formación del sitio para el Ca^{2+} se obtuvo por mutagénesis dirigida un ADN que codifica la isoforma humana 4xb de la PMCA conteniendo la substitución de la asparagina 879 por aspartato (N879D). Resultados anteriores de nuestro laboratorio (Bredeston, L.M. y Adamo, H.P. 2004, J. Biol. Chem., en prensa) mostraron que la mutación del residuo aspártico 170 por asparagina (D170N) genera una forma activada de la PMCA. Por este motivo se construyó además una mutante doble conteniendo los cambios N879D y D170N. Se utilizó un sistema de expresión de levaduras para la producción de PMCA recombinante. Células de *Saccharomyces cerevisiae* DBY2062 fueron transformadas con el vector pMP 625 conteniendo el gen de la hPMCA4xb N879D bajo el control de un promotor PMA1 fuerte. Se seleccionaron las levaduras transformantes y se aislaron las membranas celulares. La reactividad con anticuerpos anti PMCA indicó que ambas proteínas mutantes fueron expresadas a niveles similares a los de la proteína salvaje. Los resultados muestran que es posible expresar en levaduras mutantes del transportador de Ca^{2+} de membrana plasmática humana conteniendo la substitución individual o conjunta de D170N y N879D, y sugieren que estos cambios no afectan la relación entre síntesis y degradación de la PMCA.

51. (7955) IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS DEL SITIO CATALÍTICO DE LA Ca^{2+} ATPASA DE MEMBRANA PLASMÁTICA PROBABLEMENTE INVOLUCRADOS EN LA INTERACCIÓN CON LA REGIÓN AUTOINHIBIDORA.
DE TULLIO, MATIAS B.; ADAMO, HUGO P.

*IQUIFIB-Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas,
Fac. de Farmacia y Bioquímica (UBA-CONICET)*

El sitio catalítico de la PMCA o Ca^{2+} ATPasa de membrana plasmática es bloqueado por el segmento regulador C-terminal. En la isoforma humana 4xb (hPMCA4xb), se ha postulado que una de las regiones del sitio catalítico aceptoras del C-terminal es la comprendida entre los aminoácidos 206-271. Para poner a prueba esta hipótesis hemos construido cuatro mutantes de hPMCA4xb conteniendo los cambios G209A, G210A, D223A, I227A. El estado funcional de las mutantes se analizó utilizando el sistema de rescate fenotípico en *Saccharomyces cerevisiae* K616. Debido a la inactivación de los genes que codifican los transportadores de Ca^{2+} endógenos, las células K616 no son capaces de proliferar en medios deficientes en Ca^{2+} . Las levaduras se cultivaron en un medio rico y fueron transformadas con el vector de expresión pYX conteniendo el gen de la forma salvaje de la hPMCA4xb o de las mutantes. Los clones recombinantes se seleccionaron en un medio 0.75% de base nitrogenada, 0.09% de suplemento de aminoácidos sin uracilo, 2% glucosa y 2.8 mM MES (pH 6). Ensayos de western blot y revelado con anticuerpos específicos confirmaron la expresión de las proteínas mutantes. Las pruebas de complementación se llevaron a cabo agregando al medio de cultivo 10mM CaCl_2 o 10 mM de EGTA. Tanto las levaduras que expresaron hPMCA4 como el resto de las mutantes crecieron en el medio suplementado con Ca^{2+} . Por el contrario en el medio conteniendo EGTA 10 mM, las células que expresaron la hPMCA4 salvaje no fueron capaces de crecer pero si lo hicieron aquellas que expresaron la mutante truncada CT120 que carece de la secuencia autoinhibidora. Al igual que la mutante CT120, clones que expresaron la mutante I227A crecieron en presencia de 10 mM

EGTA Los resultados sugieren que substitución de I227A activa la PMCA modificando en forma directa o a través de cambios conformacionales la interacción entre el sitio catalítico y la región autoinhibidora

52. (7989) β -GALACTOSIDASE ACTIVITY IN A MOLECULAR CROWDED ENVIRONMENT. COLLIN, ALEJANDRO ALBERTO; SANCHEZ, JULIETA MARIA; PERILLO, MARIA ANGELICA

*Depto.de Química, FCEFy N., U.N.C. Av.Vélez Sarsfield
1611, 5016 Córdoba, Argentina.*

In the present work we investigated the modulation of β -galactosidase (β -Gal) activity, stability and structure in a molecular crowded environment. Enzyme activity against β -D-ortho-nitrophenyl-galactopiranoside (ONPG) in the presence or absence of poly ethylene glycol (PEG) as the crowded agent was determined at [PEG]= 0-35% P/V, by spectrophotometry. The effect of PEG on the protein structure and the thermal behavior of the enzyme was studied through the β -Gal intrinsic fluorescence (IF). ONPG suffered a non-enzymatic hydrolysis in the presence of PEG. This phenomenon was taken into account in the experimental procedure followed to evaluate the enzyme activity. β -Gal activity changed in the presence of PEG (respect to the control). This effect reached a maximum at 25% PEG, where the activity increased a 40% respect to the control; at higher concentration, the effect was lower. The emission spectra (EI) of β -Gal were recorded in the wavelength range 300-500 nm, (excitation waveleght = 295 nm), with or without PEG at different concentrations and temperatures (28-55°C). The maximal wavelenght of β -Gal emission was red-shifted as a direct function of PEG concentration. This indicated that the Trp residues of β -Gal were localized in a more polar environment in the presence of PEG. Moreover, PEG conferred more stability to the protein against high temperature respect to pure water. Our results can be interpreted in terms of the effects of the water-structure of the solution (more ordered in the presence of PEG) on the enzyme conformation as well as on the very reaction mechanism (a water molecule is use in the second stage of the reaction mechanism). However, at present we cannot discard a direct PEG-protein interaction.

53. (8075) ESTUDIO TEÓRICO DE LA DINÁMICA GLOBAL COMÚN A MIEMBROS DE UNA MISMA FAMILIA DE PROTEÍNAS. FERNÁNDEZ ALBERTI, SEBASTIÁN; MAGUID, SANDRA; ECHAVE, JULIÁN

Universidad Nacional de Quilmes

Presentamos un procedimiento para explorar la dinámica global común entre miembros de una misma familia de proteínas. El método permite la comparación de patrones de movimiento vibracional obtenidos por análisis de modos normales. Seguido a la identificación de las coordenadas colectivas que se han conservado durante la evolución, cuantificamos la similitud dinámica dentro de una familia de plegamiento. La utilización del método de Descomposición en Valores Singulares permite definir vectores representativos de la dinámica común. Hemos considerado la familia de las globinas como caso testigo. Nuestros resultados permiten pronosticar la posibilidad del desarrollo de métodos teóricos de evolución de proteínas basados en la conservación de características dinámicas. El metodo desarrollado permite la comparación de patrones de movimiento vibracional obtenidos a partir del análisis de modos normales. Se muestra que es posible construir vectores representativos de la dinámica colectiva común a miembros de una misma familia de proteínas. Hemos podido observar un alto valor de conservación de los dos modos normales de menor frecuencia en la familia de las globinas. Sin embargo, las diferencias en la dinámica de las proteínas homólogas crece rápidamente con la frecuencia promedio de sus modos equivalentes correspondientes. El trabajo muestra que las mutaciones, dentro de una misma familia de plegamiento, permiten la conservación no solamente de características estructurales sino también dinámicas dentro de la familia.

54. 8091 PLEGAMIENTO ANÓMALO DE APOLIPOPROTEÍNA A-I INDUCE AMILOIDOSIS. TRICERRI, M. ALEJANDRA; FERREIRA, SERGIO T.

INIBIOLP, Fac. Cs. Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Las amiloidosis están caracterizadas por depósitos extracelulares de proteínas fibrilares anormales. La apolipoproteína A-I (apoA-I) humana normalmente no está involucrada con estas patologías. Sin embargo, un caso de severa amiloidosis asociada con arteroesclerosis se observó cuando la apoA-I presenta una delección de un residuo de lisina en una región central de la proteína (apoA-I Lys107-0). Para detectar los posibles factores que predisponen esta precipitación anómala, analizamos el plegamiento de la proteína mutante mencionada, comparada con la apoA-I salvaje (wt). Análisis de denaturación química y utilizando presión hidrostática, indican que la apoA-I Lys107-0 es más inestable y tiene más tendencia a formar estructura de hoja beta con el tiempo de incubación, en particular a pH ácido. En estas condiciones la denaturación deja de ser cooperativa, sugiriendo estados de plegamiento intermedio. Asimismo, la proteína mutante incubada a pH ácido presenta aumento de turbidez y una significativamente más tioflavina-T que la wt, indicando su precipitación en forma de fibras amiloides. En otros ensayos, la apoA-I Lys107-0 incubada en presencia de fosfolípidos negativos aumentó significativamente su capacidad de unión a tioflavina-T. Estos resultados sugieren que la precipitación anómala de la apoA-I Lys107-0, es mediada por conformaciones de plegamiento intermedio y estructura de hoja beta, inducidas por un descenso de pH. Esta situación puede estar favorecida por acidosis asociada a la enfermedad cardiovascular, ó por un microambiente ácido debido a la proximidad de fosfolípidos de membrana cargados negativamente. Este trabajo fue subsidiado por el Ministerio de Salud de la Nación (AR), la Howard Hughes Medical Institute, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro y Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR)

55. (8126) EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE E-NTPDASAS EN HEPATOCITOS DE TRUCHA. PÉREZ RECALDE, MERCEDES; FAILLACE, M. PAULA; PAFUNDO, DIEGO E.; SCHWARZBAUM, PABLO J

IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Las E-NTPDasas son enzimas de membrana que hidrolizan nucleósidos di- y trifosfato del medio extracelular. Estas enzimas podrían modular la regulación de volumen de células hepáticas. En hepatocitos de trucha el medio hipotónico induce aumento de volumen, seguido de una disminución volumétrica llamada RVD. Se postuló que el RVD puede ser mediado por ATP extracelular, y que la [ATP] puede ser modulada por E-NTPDasas. Se utilizaron hepatocitos de trucha para: 1) identificar E-NTPDasas y caracterizar su actividad; 2) establecer su función durante el RVD. Como los nucleótidos son impermeables al hepatocito, la liberación de [g-(32)P]Pi de [g-(32)P]ATP permite estimar la actividad ATPásica de una E-NTPDasa, mientras que la formación de [a-(32)P]Pi de [a-(32)P]ATP permite verificar la presencia de ectoenzimas que desfosforilan totalmente el ATP. En presencia de 5 µM [g-(32)P]ATP la actividad ATPásica fue 0.21±0.02 nmol/10[6] cels/min mientras que con 5 µM [a-(32)P]ATP, la actividad fue 7.1±0.4x10[-3] nmol/10[6] cels/min. La actividad ectoATPasa vs ATP (0.5 µM a 1 mM) mostró un K ½ de 246 ± 105 µM. Si en hepatocitos de trucha el aumento de volumen generara salida de ATP y activación de RVD, la incubación de estas células con removedores de nucleótidos debería inhibir el RVD significativamente. En efecto, 3 U/ml de apirasa o de Na,K-ATPasa, inhibieron el RVD en 60-78%, demostrando que nucleótidos endógenos participan en esta respuesta. Microsomas de hepatocitos fueron examinados por Western Blot. Se utilizaron anticuerpos contra E-NTPDasas de mamífero, detectándose pro-

teínas de 55-65 kDa. Esto sugiere que existen regiones conservadas en las proteínas de ambas clases de vertebrados. Conclusión: los hepatocitos de trucha presentan al menos una E-NTPDasa con actividad ATPásica, acoplada a un sistema de desfosforilación total del ATP extracelular. E-NTPDasas estarían implicadas en la regulación volumétrica de células sometidas a medio hipotónico. Subsidios F. Antorchas, UBA, CONICET y ANPCyT (11017).

CARDIOVASCULAR, RESPIRATORIO Y RENAL 1

56. (6866) EFECTO DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO C SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA. PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR NATRIURÉTICO C. COSTA, MARIA DE LOS ÁNGELES; ELESGARAY, ROSANA; PULSONI, PAULA; BALASZCZUK, ANA; ARRANZ, CRISTINA

Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA - IQUIMEFA, CONICET.

En trabajos previos mostramos que la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS) y el aumento de óxido nítrico (NO), inducidos por el péptido natriurético atrial, participan en los efectos hipotensor y diurético del péptido. El péptido natriurético C (CNP) es otro integrante de esta familia de péptidos, se expresa en sistema nervioso, endotelio vascular, riñón y corazón entre otros tejidos y sus efectos, mediados principalmente por la interacción con los receptores NPR-B y/o NPR-C, involucran veno y arteriodilatación e hipotensión. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en la actividad de la NOS inducidos por el CNP, el tipo de receptor y los posibles mecanismos de señalización involucrados. Se midió la actividad de NOS (pmol L-[U14C] citrulina/g tejido) con L-[U14C]-arginina como sustrato luego del agregado de CNP (1µM), cANP (4-23) (1µM, agonista específico de NPR-C) y de toxina Pertussis (800 ng/ml, TxP, inhibidor de la proteína Gi) en arteria aorta, aurícula, ventrículo y riñón de ratas normotensas. La actividad de NOS en aorta, aurícula y ventrículo aumentó significativamente en presencia de CNP comparado con el basal (266.8±1.3 vs 217.3±4.4; 284.1±1.1 vs 233.6±3.6; 230.1±3.8 vs 175.3±2.8; p<0.01; respectivamente) y no mostró cambios en riñón. Sólo en aurícula, el agregado de toxina Pertussis modificó este aumento en la actividad inducido por el péptido (234.56±5.6 vs 284.1±1.1 p<0.01). En aorta y ventrículo el agregado simultáneo de CNP y cANP modificó significativamente la respuesta observada con el cANP (366.1±3.8 vs 308.4±3.1; 297.2±6.0 vs 242.2±4.9; p<0.01; respectivamente). Los resultados observados en aorta y ventrículo sugieren la participación de los receptores NPR-B y/o A en la activación de la enzima mediada por el CNP, mientras que en la aurícula el mecanismo de activación de la NOS involucraría la interacción del péptido con el receptor NPR-C asociado a la proteína Gi.

57. (7118) ANGIOTENSINA II Y SUS EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO DE LA DOPAMINA RENAL. CHOI, MARCELO R.; CORREA, ALICIA H.; TURCO, VANESA; APRILE, FERNANDO; FERNANDEZ, BELISARIO E.

Catedra De Fisiopatología, Facultad De Farmacia Y Bioquímica, UBA.

En presentaciones anteriores describimos que la Angiotensina II (ANG II), antagonizando al ANF disminuye la captación in vitro de ((3))H-DA en cortes de corteza renal de ratas Sprague Dawley, efectos que fueron mediados por el receptor AT[[1]], el AMPc y la PKA. Continuamos los estudios en el mismo modelo experimental con el objetivo de caracterizar la captación como extraneuronal, descartar la participación de los receptores AT[[2]] y observar si el proceso se produce en otras zonas renales. Se incubó con ANG II 100 nM en presencia de nomifensina 17 µM para bloquear la captación neuronal. La ANG II disminuyó la captación de ((3))H-DA (dpm/g ±ESM; n= 6-12) en corteza externa: control (C):

9.67±0.27, ANG II: 7.62±0.23(##), corteza yuxtamedular: C: 6.79±0.17, ANG II: 5.72±0.25* y médula renal: C: 5.53±0.21, ANG II: 5.52±0.38. La curva en función del tiempo mostró que la inhibición fue significativa a los 30 minutos (n= 6): C: 10.62±0.92, ANG II: 8.01±0.46**. El efecto de la ANG II 100 nM fue inhibido por hidrocortisona 100 µM (HC) (n= 5-8): C: 6.82±0.09, ANG II: 5.66±0.16(##\$), HC: 5.77±0.16**(\$), HC±ANG II: 4.97±0.18(##). El bloqueante del receptor AT[[2]], PD 123319 1 µM no inhibió el efecto del péptido (n= 4-10): C: 9.67±0.42, ANG II: 7.62±0.23**, PD 123319: 9.78±0.76(##), ANG II + PD 123319: 6.25±0.38(##)^ (*p<0.05; **p<0.01; (##)p<0.001 vs control; ((\$)p<0.05 vs ANG II+HC, (##)p<0.05 vs ANG II, ^p<0.001 vs PD; Student, ANOVA-Tukey). Conclusión: la ANG II disminuye la captación de DA en riñón a los 30 minutos de incubación a través de receptores AT[[1]], descartándose a los AT[[2]]. La captación es de tipo extraneuronal y se produce tanto en corteza externa y yuxtamedular pero no en la médula renal.

58. (7135) DEFICIENCIA DE ZINC DURANTE EL CRECIMIENTO: EFECTOS A NIVEL RENAL. TOMAT, A; INSERRA, F (1); VALLONE, C; VEIRAS, L; GONZALEZ, A; ORTIZ, MC (2); BALASZCZUK, AM; ARRANZ, C

Cátedra de Fisiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. IQUIMEFA. CONICET. (1) Instituto de Inv. Cardiológicas. Fac. de Med. UBA. CONICET. (2) Cát de Biología Celular. FFyB. UBA.

Previamente mostramos que la deficiencia moderada de Zinc durante el crecimiento produce un aumento de la presión arterial y una disminución de la actividad de la óxido nítrico sintasa (ONS) en el tejido renal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la función y estructura renal en dos grupos de ratas que recibieron durante el crecimiento (desde el destete y durante 2 meses): Dieta control (DC: 30 ppm Zinc, n=8) ó Dieta deficiente en Zinc (DB: 8 ppm Zn²⁺, n=8). A los 60 días, se midió el contenido de Zinc en plasma y riñón, el clearance de creatinina (Ccrea) y la intensidad de quimioluminiscencia urinaria espontánea (Io), marcador de estrés oxidativo in vivo. El riñón se fijó con formol 10%, se tiñeron con H&E y T. de Masson, se inmunomarcó con anticuerpos monoclonales para alfa-SM-actina (α-SMA) y se determinó la relación entre el área del ovllo capilar y el área glomerular total (% área ovllo). La presencia de menores niveles de Zinc en plasma (mg/dl) (0días: DC: 182±5 vs DB: 179±5; 60 días: DC: 205±12 vs DB: 135±11*, *p<0.05) y en el tejido renal (ug/g tej) (60 días: DB: 20.05±0.57*, DC: 26.86±0.40, *p<0.01) indica que los mismos desarrollaron una deficiencia moderada de este mineral. A los 60 días pudo observarse una disminución en los valores del Ccrea (DB= 0.69±0.13* vs DC= 1.31±0.18, *p<0.01), una disminución en el % área ovllo (DB: 54.95 ± 1.80*, DC: 67.20 ± 1.70, *p<0.0001) y un aumento en la Io (cpm) (DC= 24.4 ± 3.8; DB= 7.2 ± 0.3*; *p<0.001). El patrón de marcación α-SMA en corteza y medula renal fue similar en ambos grupos. La deficiencia moderada de zinc durante el crecimiento induce una disminución de la filtración glomerular que podría estar asociada a una menor superficie de filtración glomerular. La marcación con anticuerpos α-SMA sugiere que la deficiencia de zinc no genera daño tisular renal. El aumento de la intensidad de quimioluminiscencia urinaria estaría relacionado con un aumento del estrés oxidativo en los animales con dieta restringida en zinc.

59. (7484) HOMEOSTASIS DEL SODIO EN RATAS CON ESTRÉS Y CARGA DE SAL. BINOTTI, S; PUEBLA, M; BENSI, N; BERTUZZI, M; GAUNA, H; NIEBYLSKI, A

UNRC. Ruta 36 Km 601 Río Cuarto, Cba. Fisiología Animal, UNRC. Río Cuarto, Argentina

El volumen del LEC está determinado por la cantidad total de solutos osmóticamente activos, de los cuales el Na⁺ es el factor más importante. Es conocido que los cambios en el volumen del LEC están relacionados con variaciones en la presión arterial. El objetivo fue investigar la homeostasis del Na⁺ en ratas sometidas a diferentes cargas de sal y tipos de estrés. Se

utilizaron ratas Wistar macho adultas divididas en 3 grupos: 1) con 6 ml de NaCl 0.9% vía intraperitoneal (i.p.) por 3 días (F); 2) con 6 ml de NaCl 3.75% vía ip por 3 días (H) y 3) con opción a beber NaCl 1.5% 3 días previos al experimento (B). Al cuarto día cada grupo se subdividió en controles (C) y estresados (E) por inmovilización (IMO). Se determinó la natremia y la corticosterona (COR) plasmática antes de la i.p. y a los 60 y 150' post-i.p. o post-IMO. Se cuantificó la diuresis y la natriuresis a las 6 hs post-IMO. Las ratas con i.p. aumentaron los niveles de COR a los 60' post-i.p. (p<0.05) y tienden a retornar a los valores basales a los 150'. La COR post-IMO fue mayor que el valor basal en BE (p<0.05), disminuyendo posteriormente (p<0.05). La IMO produjo antinatriuresis en los 3 grupos (p<0.05), siendo la natriuresis en F y H mayor que en B (p<0.05). El primer día la natremia aumentó a los 60 y 150' en H (p<0.05); no encontrándose diferencias en F. En el día 3, la natremia basal en H fue mayor que en el día 1 (p<0.05), mostrando un aumento menor a los 60' post-i.p. La natremia en F fue menor que en H y no se encontraron cambios en B. El efecto antinatriurético se observó independientemente de la carga de sal y/o de la historia previa de estrés. Las ratas con más carga de sal presentan más dificultad para regular el aporte de Na⁺ quedando con valores basales mayores. Esto indicaría que tanto la i.p. como la IMO se comportan como estresores de magnitud semejante en la excreción de Na⁺. Este hecho y el aumento basal de la natremia en ratas con más carga de sal indicaría un factor de riesgo importante en animales sometidos a estrés y con alta ingesta de sal.

60. 7588 PARTICIPACION DEL SISTEMA FOSFATIDIL INOSITOL 3 KINASA (PI3K) –PROTEINA KINASA B (PKB) EN LA SEÑALIZACION QUE REGULA LA CAPTACION DE DOPA EN EL TUBULO PROXIMAL ESTIMULADA POR LA INSULINA. NOWICKI, SUSANA; CARRANZA, MARIA ANDREA

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CEDIE-CONICET

Demostramos previamente que la insulina (200 uU/ml; IN) incrementa en un 60% la captación de L-dopa (LD) por células aisladas del túbulo proximal de rata (cTP), y que este efecto depende de la activación de la Tirosina Kinasa. Es sabido que proteínas fosforiladas en tirosina activan la PI3K, y se ha sugerido que su precisa localización intracelular es esencial para la activación de señales «torrente abajo». Dada la escasa información sobre los segundos mensajeros que median la facilitación de la captación de aminoácidos por la insulina, nos propusimos estudiar las vías involucradas en este efecto en el túbulo proximal. El objetivo de este trabajo es analizar si la insulina activa el sistema PI3K-PKB en cTP y si esta vía participa en la regulación de la captación de L-dopa. La captación de LD se midió como el contenido intracelular de LD, en células proximales aisladas incubadas con LD (200 nM). Las fracciones citosólicas y de membrana se aislaron por ultracentrifugación, y la expresión de proteínas se determinó por Western blot. La inhibición de la actividad de PI3K (Wortmanina 0,1 uM, WT; ó LY294002 25 uM, LY) revirtió la estimulación de la captación de LD producida por la IN, sin modificar la captación de LD la condición control (en pg LD/mg prot: LD control 324±47; LD+LY 284±35; LD+WT 361±40; LD+I 517±68*; LD+LY+I 391±45; LD+WT+I 374±51, *p<0.05 vs LD). La activación de la PI3K por la IN en cTP fue corroborada por la translocación dosis dependiente de la PI3K del citosol a la membrana en presencia de IN (50-1000 uU/ml). La activación de la PKB por la IN (50-1000 uU/ml) se corroboró: 1- por el incremento dosis dependiente de la señal de PKB fosforilada en homogenatos de cTP, que fue inhibido por WT; 2- por la translocación dosis dependiente de la PKB del citosol a la membrana. Nuestros resultados indican que la insulina participa en la regulación de la captación de L-dopa en el túbulo proximal utilizando la vía PI3K-PKB.

61. (7640) ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NADPH-DIAFORASA) EN MÁCULA Densa DE RATAS

CON DIFERENTE INGESTA DE SODIO. DE LUCA SAROBE, VERÓNICA; LOIDL, FABIÁN; ARRIZURIETA, ELVIRA; LÓPEZ, EM; LÓPEZ-COSTA, JUAN JOSÉ; COIRINI, HÉCTOR; IBARRA, FERNANDO

Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, Fac Medicina, UBA. Instituto de Biología Celular y Neurociencias «Eduardo De Robertis», IByME, Fac. Medicina,UBA-CONICET

La óxido nítrico sintasa (NOS) genera óxido nítrico e interviene en la regulación del feedback túbulo glomerular bloqueando el efecto de la ANG II. La mácula densa (MD) presenta expresión y actividad de la isoforma neuronal de la NOS (nNOS). Con el objeto de evaluar los posibles cambios de actividad de nNOS en MD inducidos por el consumo de sodio con y sin bloqueo de ANG por losartán, se estudiaron ratas Wistar macho de 250-300g de peso que recibieron durante 5 días dieta habitual con NaCl 0.24% (NS), dieta deficiente en NaCl (LS) y dieta alta en sodio con NaCl 1% en el agua de bebida (HS). El losartán se administró a razón de 20 mg/Kg de peso po a un subgrupo de ratas LS. La actividad de nNOS se midió indirectamente por técnicas de histoquímica detectando la NADPH-diaforasa (NADPH-d) y el filtrado glomerular (FG) y flujo plasmático renal (FPR) por inulina y paraaminohipurato. El FG y el FPR del grupo LS fue mayor que el del grupo HS (ml/min/100gPC): 0.7±0.03 vs 0.46±0.04, p<0.01 y 2.61±0.03 vs 1.7±0.07, p<0.05, respectivamente. La actividad de la nNOS estuvo presente en el grupo con LS y no se modificó por el tratamiento con losartán. Los controles mostraron una señal de intensidad semejante pero en HS la señal, aun presente a las 24 hs de dieta, se tornó indetectable a los 5 días. Estos hallazgos sugieren la participación del óxido nítrico de la MD en la adaptación de la hemodinamia glomerular a los cambios de Na+ en la dieta, que podrían ser concomitantes con los de ANG II pero no dependientes de ella. (UBACYT M020).

62. (7823) EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA V-H-ATPASA SOBRE LA CINÉTICA DE ACIDIFICACIÓN PROXIMAL EN RIÑÓN DE RATAS SENILES. CORTI, T.; LOPARDO, M.; DIAZ SYLVESTER, P.; AMORENA, C.

ECyT, Universidad Nacional de Gral San Martín; ININCA, Facultad de Medicina, UBA.

La acidificación proximal en las ratas seniles esta afectada principalmente debido a la disminución de la actividad del intercambiador Na(+)-H(+) (Am.J.Physiol 280:R1627, 2001). Sin embargo estos animales no estan en acidosis. Nosotros tenemos evidencias de que en los animales seniles aparece un aumento en la expresión de la V-H(+)-ATPasa que podría estar compensando el defecto del intercambiador. En este trabajo exploramos con técnicas de micropuntura la cinética de acidificación proximal con soluciones de HCO₃[3] 24 mM en ausencia (C) y en presencia de bafilomicina 5x10(-2) mM (B) agregada a la luz tubular. Utilizamos ratas de 3 meses (3M) y de 18 meses (18M) de edad. Se calculó el flujo de protones (J[H](+)) = t/2 x (HCO₃[3][t=0]-HCO₃[3][t=ss] x r/2, donde t/2 es el tiempo medio (0.693/k), t=0 y t=ss son las concentraciones de HCO₃[3] a tiempo 0 y en estado estacionario y r el radio tubular en cm. Los resultados se muestran en la tabla. La bafilomicina redujo el J[H](+) en los animales de 3M un 30% y en los de 18M 50%. La caída del J[H](+) debida a la B en los animales seniles fue significativamente mayor que en los jóvenes. (ANOVA y Newman-Keuls) ¹ p,0.05 vs C 3M y ² vs C 18M.

	t/2 (s)	pHss	J[H](+)(nmolxcm(-2).s(-1))
Control 3 M	4.79±0.31 (39)	6.89±0.012 (39)	2.12±0.16 (39)
Bafilomicina 3 M	6.62±0.56 (43)	6.90±0.007 (43)	1.50±0.1 (43) ¹
Control 18 M	7.9±0.61 (41)	6.75±0.018 (41)	1.53±0.12 (41) ¹
Bafilomicina 18 M	11.4±0.95 (29)	6.90±0.008 (29)	0.87±0.7 (29) ²

Estos resultados indican que la V-H(+)-ATPasa juega un rol más importante en la recuperación de HCO₃(3) en el túbulo contorneado proximal de las ratas seniles que en las jóvenes, pudiendo ser un mecanismo de compensación.

63. (7842) ACIDIFICACION TUBULAR PROXIMAL EN RATAS UNINEFRECTOMIZADAS EXPANDIDAS: PARTICIPACIÓN DE LA ENZIMA DE CONVERSIÓN. AMORENA, C.; MAC LAUGHLIN, M.

ININCA, UBA,CONICET; ECyT Universidad Nacional de General San Martín

En ratas uninefrectomizadas (1R) demostramos que existe una mayor participación del sistema renina angiotensina (SRA) local en el control de la rebsorción proximal de Na(+)- y HCO₃(-). Por otra parte, en trabajos previos, habíamos demostrado que ratas 1R presentan una alteración en el manejo tubular proximal de estos iones durante la expansión (E) del volumen extracelular. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la inhibición de la enzima de conversión en la acidificación tubular proximal en ratas 1R durante la E. Se utilizaron ratas dos riñones (2R) y 1R (4 semanas después de la uninefrectomía). Eran preparadas para micropunción y se realizaba perfusión luminal con Ringer HCO₃(-), midiéndose la cinética de acidificación. Después de un período basal (B), se efectuaba una E (5% del peso corporal) con Ringer HCO₃(-). En ambos períodos, se efectuaba una medición Control (C) (perfusión luminal con Ringer) y una Ramipril (R) (Ringer mas R 10(-5)M). En la siguiente Tabla se presentan los valores de constante de velocidad de acidificación (k) en s(-1) de ratas 2R y 1R en estado B o E con perfusión luminal C o R. Los datos se presentan como media±SEM (n). Las significancias son: * p<0.05 vs B; # p<0.05 vs C; (&) p<0.05 vs 2R.

2RBC	2RBR	2REC	2RER
0.14±0.01 (32)	0.19±0.02 (26)	0.25±0.03 (20)*	0.31±0.03 (22)*
1RBC	1RBR	1REC	1RER
0.30±0.04 (31)&	0.19±0.02 (32)#	0.27±0.03 (35)	0.30±0.02 (30)*

La enzima de conversión no participa en la modulación de la acidificación tubular proximal en ratas uninefrectomizadas o 2R expandidas, pero si en los animales 1R sin expandir. Esto puede ser interpretado como que el estado basal de los animales 1R es de una expansión relativa.

64. (7873) EL AUMENTO DE LA VISCOSIDAD (SHEAR STRESS) EN LOS CAPILARES PERITUBULARES HIPERPOLARIZA LA MEMBRANA BASOLATERAL. LOPARDO, MARIANO; CORTI, T; AMORENA, C

ININCA, Facultad de Medicina, UBA. ECyT, Universidad Nacional de General San Martín.

En trabajos anteriores encontramos que el endotelio de los capilares peritubulares afecta funcionalmente al intercambiador Na-H de la membrana apical del túbulo contorneado proximal de rata (Am.J.Physiol. 280: F239, 2001). Cambios en la viscosidad en los capilares inducen la liberación de NO el que modula la función del intercambiador. El objetivo del presente trabajo es evaluar si cambios en la viscosidad en los capilares afectan el potencial de membrana basolateral. Se perfundieron los capilares peritubulares con solución ringer HPO₄, pH 7.4 con viscosidad 1, relativa al agua, y con Ringer HPO₄ con Dextran 400000 al 1% con un incremento en la viscosidad relativa del 50%. Las perfusiones peritubulares se realizaron en forma pausada. Se realizaron 17 mediciones en tres tubulos diferentes. La diferencia de potencial de la membrana basolateral fue 67 ± 5 mV y el aumento de la viscosidad en la perfusión peritubular generó una hiperpolarización de 6±1 mV. Estos resultados indican que el aumento de viscosidad induce un mecanismo de hiperpolarización en la membrana basolateral. Este mecanismo serviría funcionalmente para la transferencia de HCO₃ por dicha membrana, que es electrogénico, y que debería estar aumentado como consecuencia de la mayor actividad del intercambiador Na-H.

CARDIOVASCULAR, RESPIRATORIO Y RENAL 2

65. (6836) EXPRESION DE LAS SUBUNIDADES DE LA NA+, K+ ATPASA (NKA) RENAL LUEGO DE ISQUEMIA E ISQUEMIA-REPERFUSION. MOLINAS, SARA^{1,2}; TRUMPER, LAURA^{1,3}; SERRA, ESTEBAN⁴; ELÍAS, M. MÓNICA^{1,2}¹Area Farmacología. Fac. Cs Bioq. y Farm. UNR ²IFISE CONICET ³CIUNR ⁴IBR CONICET

Hemos reportado un aumento de la subunidad alfa de la NKA en riñones sometidos a 40 minutos de isquemia unilateral que se mantiene luego de 24 hs de reperfusión, tanto en corteza como en médula. La subunidad β de esta enzima no se modifica durante la isquemia pero disminuye su abundancia solo en la médula luego de 24 hs de reperfusión. Los riñones contralaterales (cl) no sufren modificaciones. Se estudió la expresión del mRNA de ambas subunidades. Se sometió a 4 ratas Wistar macho adultas a 40 minutos de isquemia unilateral sin reperfusión (I40) o seguidas de 24 hs de reperfusión (IR24), se extrajo el RNA de corteza y médula renal y se realizó RT-PCR. El mRNA de la subunidad alfa en I40 aumentó en corteza (mRNA sub alfa/actina: Control: 0.9 ± 0.04 ; I40: 1.18 ± 0.03 $p < 0.05$) y en médula (Control: 0.58 ± 0.1 ; I40: 1.0 ± 0.1 $p < 0.05$), mientras que los niveles de mRNA de la subunidad β no cambiaron. En IR24 el mRNA de la subunidad alfa retorna a los valores controles en corteza y médula, y los niveles de mRNA de la subunidad β disminuyen solo en médula (mRNA sub β /actina: Control: 0.4 ± 0.02 ; IR24: 0.2 ± 0.003 $p < 0.05$). Los riñones cl no presentaron cambios. Debido a que se conoce que la angiotensina II (AGII) puede aumentar la expresión del mRNA de las subunidades de la NKA, se estudió también si la AGII se encuentra involucrada en la regulación de la expresión de la subunidad alfa de la NKA. Se trataron los animales con losartán (80mg/kg/día, n=4), un antagonista de los receptores AT1 de la AGII, durante 3 días previos a realizar isquemia de 40 minutos sin reperfusión y se analizó la abundancia de la subunidad alfa por western blot en los riñones isquémicos. Esta subunidad continuó aumentada. Estos resultados evidencian una regulación independiente de la expresión de ambas subunidades de la NKA y ésta es diferente a lo largo de los distintos segmentos del nefrón. El aumento de la expresión de la subunidad alfa no se encontraría mediado por el receptor AT1 al menos en las condiciones estudiadas.

66. (6878) EVOLUCION DEL STRESS OXIDATIVO RENAL LUEGO DE ISQUEMIA E ISQUEMIA-REPERFUSION (IR). PELOURSON, LAURA (1); MOLINAS, SARA (1, 2); TRUMPER, LAURA (1, 3); ELÍAS, M. MÓNICA (1, 2)⁽¹⁾ Area Farmacología. Fac. de Cs. Bioq. y Farm. UNR ⁽²⁾ IFISE CONICET ⁽³⁾ CIUNR

La isquemia es una importante causa de disfunción renal. La reperfusión aunque es esencial para la sobrevivencia del tejido renal, causa daño adicional. Un aumento en la generación de radicales libres del O₂ (ROS) se ha reportado luego de la reperfusión, pero también durante isquemia sin reperfusión. Se caracterizaron distintos marcadores de stress oxidativo en corteza renal luego de un daño isquémico y de IR. Se sometieron ratas Wistar macho adultas a 40 min de isquemia unilateral sin reperfusión (I40) o seguidas de 24 hs de reperfusión (IR24). Se extrajeron los riñones isquémicos y se separó la corteza. Los controles (C) fueron sometidos a operación simulada. En I40 el ATP disminuyó y luego de 24 hs de reperfusión se normalizó. La lipoperoxidación (LPO) se encontró aumentada en I40 y disminuyó en IR24. En cuanto a los niveles de enzimas antioxidantes, en I40 e IR24 la glutatión peroxidasa disminuyó (C: 0.15 ± 0.02 ; I40: $0.11 \pm 0.01^*$; IR24: $0.06 \pm 0.01^*$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, $*p < 0.05$). La catalasa y la DT-diaforasa en I40 se mantuvieron dentro de los valores controles, mientras que en IR24 la actividad catalasa disminuyó (C: 129 ± 9 ; IR24: $109 \pm 12^*$ U/mg proteína, $*p < 0.05$) y la actividad DT-diaforasa aumentó (C: 26 ± 2 ; IR24: $40 \pm 2^*$ nmol/min/mg proteína, $*p < 0.05$). Debido a que se conoce que la angiotensina II (AGII) puede indu-

cir la formación de ROS, se estudió también si la AGII se encuentra involucrada en este proceso. Se trataron los animales con losartán (80 mg/kg/día), un antagonista de los receptores AT1 de la AGII, durante 3 días previos a realizar isquemia de 40 min sin reperfusión. Los niveles de LPO continuaron elevados. El aumento de LPO en I40 evidencia un daño oxidativo que comienza durante la isquemia. El sistema de defensa antioxidante se encuentra alterado durante la isquemia y la reperfusión. Estas alteraciones podrían contribuir a la disfunción renal. El aumento de LPO no se encontraría mediado por la interacción entre la AGII y el receptor AT1, al menos en las condiciones estudiadas.

67. (6901) EFECTOS DE PARACETAMOL (APAP) SOBRE LA UNIÓN AL CITOESQUELETO DE LA NA+, K+ ATPASA (NAKA) RENAL EN PRESENCIA DEL INHIBIDOR DE CALPAÍNA SJA7029. TRUMPER, LAURA; MOLINAS, SARA; MONASTEROLO, LILIANA; GABRIELA, COUX; GARCÍA, VERÓNICA; ELÍAS, MÓNICA

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

Anteriormente mostramos el debilitamiento de la unión a membrana de la NaKA y la activación de calpaína en células renales incubadas con APAP. Nuestro objetivo fue analizar si la activación de calpaína contribuye a los efectos de APAP sobre la unión de NaKA al citoesqueleto. Se trabajó con una suspensión en fresco de células corticales renales de rata, incubadas durante 30 min con APAP en concentraciones: 0 (C), 0.1, 1, 10 y 100 mM en presencia o ausencia del inhibidor de calpaína SJA7029 (S). S (100 μM) fue agregado al medio de incubación 5 min antes que APAP. Al finalizar la incubación se midió liberación de LDH, y las células luego se incubaron con buffer conteniendo 0.1% Tritón X-100 o se midió la actividad de calpaína. En las fracciones Tritón soluble (TS) y Tritón insoluble (TI) se analizó la abundancia de las subunidades alfa 1 y beta 1 de NaKA por Western blot. La liberación de LDH sólo difirió del valor control en las células incubadas con APAP 100 mM (C= $8.0 \pm 1\%$, APAP 100 mM= $42.0 \pm 4\%$; $p < 0.01$, n=6). La actividad de calpaína se expresó como % de cambio respecto del C y aumentó luego de la incubación con APAP (APAP 0.1= $135 \pm 12\%$, APAP 1= $158 \pm 14\%$, APAP 10= $179 \pm 12\%$, APAP 100= $170 \pm 14\%$, $p < 0.05$ comparado con C). S disminuyó la actividad basal de calpaína (C= 0.27 ± 0.02 ; S= 0.14 ± 0.02 nmol /min/mg proteína; $p < 0.01$; n= 4) y previno de su activación por APAP. S redujo la liberación de LDH en células expuestas a APAP 100 mM (APAP 100= $42.0 \pm 4\%$, S+APAP100= $15.1 \pm 1.7\%$, $p < 0.01$, n= 4). APAP provocó un aumento de las subunidades alfa 1 y beta 1 en las fracción TS y una disminución de ambas en TI. Esto no se modificó en presencia de S. Estos resultados sugerirían que la inhibición de calpaína protegería del daño en membrana provocado por APAP. La activación de calpaína no contribuiría al desprendimiento de NaKA de su unión a membrana, o al menos no sería el principal evento responsable de este fenómeno.

68. (6934) LA SOBRECARGA AGUDA DE SODIO EN LA RATA PROVOCA REACCIÓN INFLAMATORIA ENDOTELIAL Y TÚBULO-INTERSTICIAL RENAL. ROSÓN, MARÍA¹; CAVALLERO, S.¹; CAO, G.⁵; GORZALCZANY, S.³; PANDOLFO, M.²; KUPREWICZ, A.²; DELLA PENNA, S.¹; CANESSA, O.⁴; TOBLLI, J.E.⁵; FERNÁNDEZ, B.E.¹Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.¹. Cát. de Bioquímica Clínica², Farmacología³ y Anatomía⁴, FFyB, UBA, Hospital Alemán⁵

Se demostró que la sobrecarga crónica de sodio incrementa la expresión de factores proinflamatorios en el riñón y que la presencia de células inmunes induce retención salina e hipertensión arterial. El objetivo del presente trabajo fue examinar si una sobrecarga aguda de sodio es capaz de desencadenar una reacción inflamatoria renal. Se utilizaron ratas macho SD (270-350 g), perfundidas por vía endovenosa con NaCl en con-

centraciones crecientes: 0.9% (C), 3% (Na3), 6% (Na6) y 9% (Na9) y se evaluaron las lesiones endoteliales y túbulo-intersticiales (inmunohistoquímica) con anticuerpos monoclonales anti marcadores transforming growth factor-Beta 1 (TGF- β 1), RANTES y alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA). Se determinó excreción fraccional de sodio (EF Na), clearance de creatinina (Cl Cr) y presión arterial directa (PA). Los resultados mostraron aumento en la EF Na (%; C: 0.14 \pm 0.03, Na3: 3.94 \pm 0.71*, Na6:10.07 \pm 0.69**, Na9:17.16 \pm 2.18**; n=6-8, * p<0.05 ** p<0.01vs C), sin cambios en el Cl Cr y la PA. Por histología se observó una discreta vacuolización en túbulo proximal en Na9. Por inmunohistoquímica (%; n=4) se observó incremento de marcaje concentración dependiente en Na6 y Na9 para TGF- β 1(C:5.3 \pm 1.1, Na6:10.6 \pm 1*, Na9: 19.7 \pm 3.1** §) y para alfa-SMA (C:0.46 \pm 0.13, Na6:0.65 \pm 0.14, Na9: 5.13 \pm 0.96** §§) y marcación positiva para RANTES en células endoteliales glomerulares (C: 0.7 \pm 0.8; Na6: 7.5 \pm 1.9**; Na9: 20.8 \pm 2.2**§§), endoteliales peritubulares (C: 0.3 \pm 0.4; Na6: 1.3 \pm 0.4*; Na9: 4.5 \pm 1.1**§§) y células tubulares (C: 0.6 \pm 0.8; Na6: 22.1 \pm 2.2**; Na9: 9.4 \pm 1.3**§§). * p<0.05 y ** p<0.01vs C; § p<0.05 y §§ p<0.01vs Na6, ANOVA. Conclusiones: Una sobrecarga aguda de sodio produce per se reacción inflamatoria en el endotelio glomerular y peritubular y en el túbulo-intersticio renal, detectada en forma precoz e independiente de las alteraciones hemodinámicas.

69. (7124) ESTUDIO DE VISCOSIDAD COMPLEJA EN HIPERTENSOS. D'ARRIGO, MABEL; RIQUELME, BIBIANA; FORESTO, PATRICIA; RACCA, LILIANA; FILIPPINI, FERNANDO; VALVERDE, JUANA

Depto. Bioquímica Clínica Facultad De Cs Bioq. Y Farm U.N.R. Lab. Inmunohematología, Depto. Bioq. Clínica, Area Física, IFIR, CONICET. Fac. Cs. Bioq. Y Farm. UNR

El objetivo de este trabajo fue estudiar los parámetros viscoelásticos dinámicos y estacionarios de la membrana eritrocitaria en pacientes hipertensos (13) comparados con los correspondientes a individuos normales (20). Los parámetros hemorreológicos de la membrana eritrocitaria fueron realizados por difracción láser en condiciones estacionarias (índice de deformabilidad: ID, módulo elástico: μ , viscosidad superficial de membrana: VM y tiempo de retardo característico: TC) y en condiciones dinámicas similares al ritmo cardíaco de 60 ciclos/min (elasticidad dinámica: G' , pérdida dinámica: G'' , componente viscosa de viscosidad compleja: V'). Estos parámetros permiten estudiar el comportamiento de los eritrocitos en circulación, evaluando su capacidad de respuesta y recuperación ante determinadas condiciones de flujo.

Parámetros	Control normotensos	Pacientes HTA	Probabilidad asociada
DI	0.69 \pm 0.03	0.64 \pm 0.04	NS
μ (10-6) N/m)	8.1 \pm 1.2	5.3 \pm 1.8	p < 0.05
VM(10-7 N.s/m)	3.6 \pm 0.3	3.8 \pm 1.0	NS
TC(10-1 s)	0.44 \pm 0.10	0.77 \pm 0.18	p < 0.05
G'	7.3 \pm 0.9	4.75 \pm 1.50	p < 0.01
G''	3.52 \pm 0.40	2.0 \pm 0.6	p < 0.01
V'	0.56 \pm 0.06	0.31 \pm 0.09	p < 0.01

Los resultados obtenidos muestran alteraciones en parámetros hemorreológicos de la membrana eritrocitaria en pacientes hipertensos, respecto a los individuos sanos. Estos estudios aportan información de las propiedades de membrana eritrocitaria en condiciones de tensión similares a la que están sometidos los glóbulos rojos en circulación, poniendo de manifiesto alteraciones en situaciones de anormalidad.

70. (7227) EFECTOS DE LA ISQUEMIA/REPERFUSIÓN (IR) SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA NA+, K+-ATPASA (NKA) A MEMBRANA EN CORTEZA RENAL. COUX, GABRIELA (1); TRUMPER, LAURA (2); WAYLLACE, NAHUEL; ELIAS, MONICA (1)

Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. (1) CONICET, (2) CIUNR

Con anterioridad informamos que la isquemia renal promueve un aumento de la abundancia de la subunidad alfa pero no de la beta de la NKA en homogeneizados de corteza renal. También observamos la aparición de actividad NKA en el dominio apical lo cual podría sugerir la despolarización de la enzima. La localización basolateral de la NKA depende de su asociación con proteínas del citoesqueleto que conducen a la formación de un complejo insoluble en detergentes. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos de distintos tiempos de isquemia seguida o no por reperusión sobre la asociación al citoesqueleto de membrana de ambas subunidades de la NKA. Se trabajó con las cortezas renales de ratas Wistar macho adultas sometidas a 5 y 40 minutos de isquemia unilateral (I) seguidas o no por 1 hora de reperusión (I5, I40, IR5; IR40) y los correspondientes controles (C). Las cortezas se homogeneizaron en un buffer con Triton X-100 0.2% y se centrifugaron. Los sobrenadantes se separaron (fracción soluble a Triton (TS)) y los pellets se resuspendieron en el mismo buffer (fracción insoluble (TI)). Se determinó la actividad NKA y se detectó la presencia de las subunidades alfa y beta por Western-blot. La actividad NKA aumentó significativamente en TS en I40 (C=5.7 \pm 0.5, I40=15.1 \pm 2.4 umolPi/h.mg Prot, p<0.05). La subunidad alfa presentó un aumento en TS en los grupos I5, I40 e IR40. La subunidad beta no sufrió cambios significativos. Los resultados obtenidos sugieren que durante I/R las subunidades alfa y beta muestran un comportamiento diferente. Las subunidad alfa presenta una mayor solubilidad al Triton X-100, sugiriendo que está parcialmente disociada del citoesqueleto. Una hora de reperusión restablece la unión a membrana luego de isquemia breve (5 min) pero no repara lo ocurrido luego de 40 min de isquemia. Este sería el primer paso para la redistribución de la enzima que hemos observado previamente.

71. (7496) INJURIA RENAL POR DEFICIENCIA DE COLINA Y ESTRÉS OXIDATIVO. OSSANI, GEORGINA; ALVAREZ, SILVIA(1); FIORI, MARIANA; PERAZZO, JUAN(2); BOVERIS, ALBERTO(1); MONSERRAT, ALBERTO

Patología Experimental, FMED.UBA. (1) Laboratorio De Radicales Libres y (2) Cátedra De Fisiopatología, FyB, UBA

La deficiencia de colina produce una variada patología como ser hepática, cardiovascular, hemolinfocítica, etc. Asimismo, en ratas recién destetadas, induce un cuadro de IRA con lesiones morfológicas que varían desde la necrosis tubular focal hasta la necrosis cortical masiva. En estudios anteriores (Monserrat y col. 1969) hemos demostrado que fenómenos de lipoperoxidación podrían jugar un rol patogénico en el desarrollo de la necrosis renal. El propósito de este trabajo fue profundizar en el estudio del estrés oxidativo (EO) en este modelo. Ratas recién destetadas fueron alimentadas con dieta colina deficiente (CD) y colina suplementada (CS) y sacrificadas secuencialmente desde el día 3 hasta el día 7. Se midió urea y creatinina en suero, se realizó estudio histopatológico de los riñones, se midió malonaldehído por la técnica de TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) y quimioluminiscencia inducida por hidropéroxido de terbutilo. El estudio morfológico mostró en el grupo CD necrosis renal en 3/6 ratas al día 6 y en 4/4 ratas al día 7. La concentración de urea y creatinina se correlacionó con la lesión renal. Los niveles de malonaldehído fueron superiores en el grupo CD, siendo la diferencia estadísticamente significativa al día 3 y 5. La quimioluminiscencia fue mayor en el grupo CD, mostrando diferencia estadísticamente significativa a partir del día 5. El EO precede al daño morfológico renal. Los resultados obtenidos confirman y extienden el rol patogénico que el EO podría jugar en el desarrollo de la necrosis renal en este modelo.

72. (7620) ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO EN INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA) EN RATAS. SALVARREY, MARCELA; MORENO, JOSÉ; ELÍAS, MÓNICA (1); SABALL, ESTER

Area Inmunología. Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (1) Area Farmacología, CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

La injuria renal está asociada con la activación local del sistema de complemento (SC) que conduce a la generación del complejo citolítico terminal C5b-9 (TCC). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la probable participación del SC en la IRA, empleando el modelo experimental de IRA inducida por HgCl₂ en ratas. La demostración del depósito tisular de productos de activación del SC, expresando neoantígenos, constituye una importante evidencia de su participación en procesos patológicos. Aplicando ese criterio realizamos estudios ex vivo determinando por inmunofluorescencia la presencia de neoantígenos de C9 empleando el anticuerpo monoclonal C5b-9, aE11 y anti-ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína, en cortes criostáticos de riñones de ratas control (RC, n=3) y luego de 1 hora de una única inyección de HgCl₂ (5 mg/kg peso, sc) (RT, n=3), alcanzándose una concentración plasmática de 55 µM. En el tejido de RT se observó el depósito de TCC con localización preferentemente tubular. No se observaron depósitos en RC. Se analizaron al menos 2 cortes de cada rata. Para estudiar si la activación puede ser atribuida a un efecto directo del HgCl₂ realizamos estudios in vitro midiendo la actividad hemolítica remanente del suero de rata (Técnica CH50) post-incubación con HgCl₂ 55 µM, n=6. Se utilizó el Test de rangos-signos de Wilcoxon. La actividad de SC remanente (mediana=7.39, ds=0.39, RI=0.62) resultó significativamente menor respecto del control (mediana=10.22, ds=1.7, RI=2.7); p < 0.05. Esto podría deberse a un efecto activador de la droga que provoca el consumo del SC. El depósito de TCC en riñón con expresión de neoantígenos de C9, demuestra la activación in vivo del SC en el cuadro de IRA inducido por HgCl₂ en ratas. Esto sugiere además el carácter local de tal activación, que podría ser iniciada por el HgCl₂ que rápidamente se concentra en ese órgano.

73. (7685) AUTOANTICUERPOS Y ENFERMEDAD RENAL (ER). MORENO, JOSE; ABRAHAM, NIDIA; TOFFI, ALICIA; BOTTAI, HEBE (1); IVANCOVICH, JUAN (1); LEROUX, BIBIANA (2); SABALL, ESTER; LEIVA, MERCEDES (1)

Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR (1) Area Estadística. Fac. Cs. Bioq.y Farm. UNR. (2) Cát. Dermatología. Fac. Cs. Médicas. UNR

En un trabajo anterior realizado con un grupo reducido de pacientes con ER observamos que los valores de anti-Fibronectina (a-Fn) en los pacientes anti-Histonas (a-His) y ANCA positivos, eran significativamente mayores que los observados en los simples positivos y doble negativos, lo cual sugería algún grado de asociación entre ellos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar esa probable asociación en un grupo de 159 pacientes con ER diagnosticada, incorporando al estudio un grupo de 84 pacientes con Esclerodermia (ES) diagnosticada sin manifestaciones clínicas ni de laboratorio de ER. Las determinaciones de a-Fn y a-His se realizaron por ELISA considerando la prueba positiva si el valor de absorbancia era mayor al valor de corte (VC). ANCA se determinó por inmunofluorescencia indirecta. Esta variable fue categorizada en negativo-positivo. Resultados: a-Fn (VC 0.155), en ER 118 > VC; media 0.383, mediana 0.301, ds 0.298, RI 0.388; en ES 58 > VC; media 0.303, mediana 0.258, ds 0.221, RI 0.338. a-His (VC 0.33), en ER 94 > VC; media 0.506, mediana 0.389, ds 0.412, RI 0.534; en ES 40 > VC; media 0.474, mediana 0.305, ds 0.455, RI 0.353. ANCA en ER 42 +, en ES 4 +. Para el estudio de asociación entre las variables se procede a ajustar un modelo log-lineal. La estadística de verosimilitud indica que el modelo es adecuado. Se concluye que existe asociación significativa entre el resultado de ANCA y el grupo de pertenencia (p=0.03) y entre los resultados de a-Fn y a-His para ER (p=0.003). Como medida de asociación se procede a estimar las razones de odds correspondientes a través de los estimadores máximo verosímiles de los parámetros del modelo. El odds de ANCA positivo es 3.5 veces mayor en ER que en ES. En ER el odds de a-His positiva es 3.1 veces mayor en los pacientes con a-Fn positiva que en los a-Fn

negativa. Existe asociación entre ANCA y ER y en este grupo, entre a-Fn y a-His, lo cual sugiere para esta tríada de autoanticuerpos un potencial valor predictivo de ER.

74. (7732) ANÁLISIS MORFÓMETRICO EN LA ESCLEROSIS GLOMERULAR FOCAL Y SEGMENTARIA DE LA PRE-ECLAMPSIA. LAGO, NÉSTOR; HULIEV, ALEXIA; NADAL, MIGUEL (1); ALBERTO, MONSERRAT

Centro de Patología Experimental, Dto de Patología. (1) Nefrología, Hospital de Clínicas, UBA.

En la patología renal de la preeclampsia (PE), la «endoteliosis» es un hallazgo característico; ha sido reportada conjuntamente a dicha lesión la esclerosis glomerular focal y segmentaria (EGFS). Estudios morfométricos proponen a la EGFS como la resultante de la hipertrofia glomerular compensadora, y su asociación con la fibrosis intersticial, como predictora de progresión a la cronicidad. Por tal motivo se decidió estudiar área glomerular total, esclerosis glomerular y fibrosis intersticial en biopsias renales de mujeres con PE. Se realizó el estudio retrospectivo de biopsias renales efectuadas en el puerperio inmediato a 27 mujeres con diagnóstico clínico de PE. Las lesiones glomerulares reconocidas por microscopía de luz fueron divididas en dos grupos. Grupo I (n=12) sin lesión de EGFS y Grupo II (n=15) con EGFS. El área glomerular fue medida con un analizador de imágenes (Image-ProPlus), realizándose estudios semicuantitativos para medir el grado de esclerosis glomerular (grados 1 a 4) (índice de Raij) y fibrosis intersticial (grados 1 a 4) (índice de Shih). Grupo I: mediana de proteinuria 1.42 g/d; Grupo II: 6.90g/d. Índice de Shih en el Grupo I: Grado1: 2/12 y en el Grupo II Grado 1: 5/15. Índice de Raij en el Grupo I: 0 y en el Grupo II: 28. El área glomerular total, medida en micrones cuadrados (media±DS) en los glomérulos (n:188) del Grupo I fue 24664± 6649 (mediana: 23615), en el Grupo II los glomérulos sin esclerosis (n:141) midieron 22286±7781 (mediana:21261), los glomérulos con esclerosis Grado1 y 2 (n:26), 23802±11066 (mediana:18407) y los glomérulos Grado 3 y 4 (n:11), 16365 ±3401 (mediana:15471). La proteinuria fue mayor en las pacientes con esclerosis glomerular focal y segmentaria observándose un menor tamaño glomerular en los glomérulos con esclerosis grados 3 y 4, en tanto que en los glomérulos sin esclerosis del grupo II el área no fue mayor que en los glomérulos (sin esclerosis) del grupo I. Estos resultados difieren parcialmente de los obtenidos por otros autores.

**COMUNICACIÓN INTERCELULAR 1:
MEDIADORES Y RECEPTORES**

75. (7321) INMUNOLocalIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL RECEPTOR DE IGF-1 EN ADENOhipófISIS DE RATA: EVIDENCIAS DE UN SISTEMA DE REGULACIÓN PARACRINO. GUTIÉRREZ, SILVINA; AOKI, AGUSTÍN; ORGNERO, ELSA

Centro de Microscopía Electrónica

Introducción: El IGF-1 estimula la proliferación de las células lactotropas a través de receptores tirosina quinasa. Hay controversias sobre el tipo celular hipofisario en que se expresan estos receptores. Objetivo: Determinar la localización de los receptores de IGF-1 (IGF-1R) en adenohipófisis de rata in vitro y analizar los cambios proliferativos y morfológicos por acción de dicho factor. Materiales y Métodos: Proliferación: Cultivos primarios adenohipofisarios de ratas hembras tratados por 48 ó 72h con IGF-1 solo (5, 30 ó 100 ng/ml) o combinado con genisteína (Ge) (25 µM), un bloqueante de su receptor. Se valoró la proliferación de las lactotropas por doble marcación inmunocitoquímica de bromodeoxiuridina y prolactina. Los datos se analizaron por test ANOVA-Tukey. Inmunolocalización y morfología: Se realizó detección de IGF-1R por inmunocitoquímica fotónica (IF) (sistema ABC) y electrónica (IE) (procedimiento de pre-inclusión para células intactas). Se incluyeron las células para su observación

ultraestructural. Resultados: Proliferación: El IGF-1 aumentó significativamente la proliferación de las células lactotropas, con todas las dosis aplicadas. Ge revirtió parcialmente el incremento de la actividad mitótica originada por IGF-1. Inmunolocalización y morfología: La IF reveló la presencia de células positivas para IGF-1R en cultivo de células adenohipofisarias. Mediante IE se evidenciaron células marcadas para IGF-1R con características morfológicas de gonadotropas. Las mismas presentaron gran desarrollo de las organelas proteínopoyéticas, con abundantes gránulos en el citosol. Las lactotropas de los modelos estimulados con IGF-1 mostraron una morfología ultraestructural característica de células activas en la síntesis proteica. Los resultados obtenidos nos permiten inferir la presencia de receptores para IGF-1 en células gonadotropas adenohipofisarias, evidenciando que el IGF-1 estimularía la proliferación de las células lactotropas por un mecanismo de tipo paracrino.

76. (7485) MECANISMOS MOLECULARES DE MODULACIÓN DE LA DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR NICOTÍNICO. SPITZMAUL, GUILLERMO; GUMILAR, FERNANDA; DILGER, JAMES; BOUZAT, CECILIA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas - Bahía Blanca

La desensibilización es la disminución o pérdida de respuesta biológica como consecuencia de una estimulación prolongada o repetida. Este fenómeno es una característica común de todos los miembros de la familia de receptores «cys-loop» y se observa como una caída de la corriente macroscópica durante una exposición prolongada al neurotransmisor. Los agentes farmacológicos son capaces de modular este proceso por diversos mecanismos y poseen por lo tanto una importancia fisiológica y terapéutica. Nuestro objetivo fue el de caracterizar los mecanismos de acción de compuestos que actúan sobre la desensibilización. Para ello utilizamos la técnica de «patch-clamp» en las configuraciones «cell-attached» y «outside-out». Las drogas estudiadas pertenecen a distintas familias, tales como anestésicos locales (proadifén y adifenina), drogas antimaláricas (quinacrina), antidepresivos tricíclicos (amitriptilina, imipramina y doxepina) y el colorante cristal violeta. En base a su mecanismo de acción, pudimos agrupar estos compuestos en tres grupos: a) drogas que aumentan la desensibilización desde el estado abierto del canal: quinacrina, adifenina; b) drogas que aumentan la velocidad de desensibilización desde el estado cerrado: proadifén y cristal violeta y c) drogas que actúan por ambos mecanismos: antidepresivos. También analizamos el efecto de proadifén y doxepina sobre el AChR mutado en eT264P, el cual se asocia a un síndrome miasténico congénito. Proadifén reduce la frecuencia de aperturas y doxepina disminuye la duración de las aperturas. Por diferentes mecanismos, ambas drogas serían beneficiosas para revertir la cinética alterada de estos receptores mutados. Nuestros estudios demuestran que el mecanismo de desensibilización es sumamente complejo y que es modulado por una gran variedad de compuestos actuando sobre diferentes estados conformacionales. A su vez, fármacos que aumenten la desensibilización del AChR podrían ser eficaces para el tratamiento de enfermedades asociadas a ganancia de función en estos receptores

77. (7491) ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR NICOTÍNICO POR AGONISTAS GABAÉRGICOS. BRAVO, MATÍAS; SPITZMAUL, GUILLERMO; BOUZAT, CECILIA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas - Bahía Blanca

El receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) es un pentámero de subunidades homólogas perteneciente a la familia de receptores «cys-loop» con una composición alfa[2]-beta-epsilon-delta en el AChR muscular. Dada la homología entre receptores de esta familia decidimos determinar si agonistas GABAérgicos son capaces de activar receptores colinérgicos. Con tal fin utilizamos la técnica de «patch-clamp» en la configuración «cell-attached» y activamos al AChR, normal o mutado en residuos que afectan la afinidad, con distintas concentraciones de ácido gama-

aminobutírico (GABA). El AChR salvaje es capaz de activarse a 100 μM de GABA. Comparadas con las de ACh, las aperturas de los canales son 8 veces más breves. La amplitud y duración del canal activado por GABA no se modifican con la concentración del agonista, revelando que GABA no produce bloqueo del canal. Aún a concentraciones tan elevadas como 50 mM las aperturas no ocurren como eventos sucesivos, característicos de agonistas potentes. Este hecho indica que si bien GABA activa al AChR, lo hace con muy baja potencia. Con el fin de determinar los residuos involucrados en la unión de GABA al sitio de agonista, estudiamos al receptor mutado en alfaG153. Esta posición es determinante en la unión de ACh y cuando se muta a serina aumenta la afinidad. alfaG153S es también mucho más sensible a la activación por GABA. Los canales se pueden detectar a partir de 1 μM de GABA y se observan numerosas aperturas sucesivas. Las propiedades cinéticas son similares a las observadas por activación con ACh sobre el mismo receptor. Como conclusión, determinamos que GABA es un agonista débil del AChR y el residuo alfaG153 se encontraría involucrado en la afinidad de GABA por el AChR y su potencia de activación. Subsidiado por ANPCyT, UNS y CONICET.

78. (7531) CARACTERIZACIÓN A NIVEL DE CANAL ÚNICO DE RECEPTORES NICOTÍNICOS HOMOMÉRICOS. RAYES, DIEGO; SPITZMAUL, GUILLERMO; BOUZAT, CECILIA

Instituto De Investigaciones Bioquímicas De Bahía Blanca (INIBIBB)

La familia de receptores «Cys-Loop» comprende los receptores nicotínicos (AChRs), de serotonina (5HT[3A]), de GABA (AyC) y de glicina. Dentro de los nicotínicos existen receptores heteropentaméricos y el homopentámero alfa-7 neuronal. Dado su rol esencial en diversos procesos del sistema nervioso, la farmacología de este último ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo no se ha logrado hasta el momento una caracterización electrofisiológica a nivel de canal único debido a su baja expresión en sistemas heterólogos. Con la finalidad de encontrar un modelo válido para realizar este estudio, utilizamos un receptor quimérico que contiene el dominio extracelular de alfa-7 y los segmentos transmembranales de 5HT[3A] y que presenta alta expresión en células. Además realizamos mutaciones sobre la región transmembranal para aumentar la conductancia y poder así resolver los canales únicos. La activación por agonistas permite observar eventos de apertura con una conductancia de 99 pS. La mínima concentración de agonista a la cual se observa activación es 10, 50 y 300 μM para nicotina, ACh y colina, respectivamente. A estas concentraciones los tiempos de estado abiertos son semejantes para nicotina y ACh y son 3 veces más breves en presencia de colina. Con ninguno de los agonistas estudiados se observan eventos repetitivos de apertura y cierre a alta concentraciones, sugiriendo un proceso de desensibilización rápido. Tanto nicotina como ACh actúan además como bloqueadores de canal abierto, siendo las constantes de afinidad para el bloqueo (K[B]) de 18.7 y 45mM, respectivamente. A su vez, se observa una reducción de la conductancia con concentraciones crecientes de Ca(++) y Mg(++), indicando un bloqueo rápido de canal abierto por parte de los mismos (K[B] = 7.8 y 4 mM, respectivamente). Este trabajo tiene como objetivo establecer un modelo válido para el estudio a nivel de canal único de la región extracelular del receptor alfa-7 con el fin de dilucidar mecanismos de acción de drogas y fármacos que modulan su actividad.

79. (7543) ACCIÓN DE LOS AGENTES ANTIHELMÍNTICOS LEVAMISOL Y PIRANTEL SOBRE RECEPTORES ALFA-7 NICOTINICOS. BARTOS, MARIANA; RAYES, DIEGO; BOUZAT, CECILIA

Instituto De Investigaciones Bioquímicas De Bahía Blanca (INIBIBB)

El levamisol y el pirantel son agentes antihelmínticos que ejercen sus efectos terapéuticos actuando como agonistas comple-

tos de receptores nicotínicos (AChR) de músculo de nematodos. En estudios previos demostramos que ambos antihelmínticos actúan como agonistas muy débiles de AChRs musculares de mamífero. En el presente trabajo investigamos mediante el registro de canales únicos y corrientes macroscópicas la acción de estos fármacos sobre el receptor alfa-7, utilizando como modelo el receptor quimérico alfa7-5HT[3A] que expresa en células de mamífero. El levamisol y el pirantel son capaces de activar a este receptor. Sin embargo, sus potencias de activación difieren dramáticamente. Los canales únicos activados por levamisol aparecen esporádicamente y sólo a concentraciones mayores que 500 μM . Sus duraciones son 30 veces menores que las observadas con ACh. Además, no es posible detectar corrientes macroscópicas cuando se aplica levamisol. Ambos resultados sugieren que el levamisol es un agonista extremadamente débil de alfa-7. Por el contrario, pirantel es capaz de activar al receptor a una concentración tan baja como 10 μM , menor que la requerida para detectar canales únicos en presencia de ACh. El tiempo de estado abierto es semejante al observado en presencia de ACh. Además, es posible observar corrientes macroscópicas de magnitud similar a las activadas por ACh. Ambos resultados revelan que el pirantel es un agonista más potente que ACh para receptores alfa-7. El estudio a nivel de canal único demuestra que además de sus acciones agonistas ambos antihelmínticos actúan como bloqueadores de canal abierto, siendo las constantes de afinidad para el bloqueo de 1.45 mM y 7.5 mM para pirantel y levamisol, respectivamente. El fin de este proyecto es identificar residuos determinantes de selectividades diferenciales de antihelmínticos por AChRs de mamífero y nematodos para contribuir al desarrollo de quimioterápicos con mayor eficacia y menores efectos adversos, e identificar sitios potenciales de resistencia a los mismos.

80. (7547) MECANISMOS MOLECULARES DE INHIBICIÓN DE RECEPTORES DE CYS-LOOP POR ANTIDEPRESIVOS TRICICLICOS. GUMILAR, FERNANDA ANDREA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca.

Además de su clásica acción de inhibición de recaptación de aminas biogénicas, los antidepresivos tricíclicos (ADT) inhiben distintos LGICs. Sin embargo, los mecanismos moleculares de inhibición y su relación con los efectos terapéuticos y adversos no han sido hasta ahora dilucidados. Dentro de posibles blancos de estos fármacos se encuentran los receptores de cys-loop, tales como receptores nicotínicos (AChRs) homo y heteropentaméricos y receptor de serotonina 5HT[3]. Hemos determinado que los ADT actúan aumentando la desensibilización rápida del AChR muscular heteropentamérico. Como parte de este proyecto estudiamos ahora la acción de ADT (doxepina, imipramina y amitriptilina) sobre receptores nicotínicos homopentaméricos, utilizando como modelo la quimera alfa7-5HT[3] que expresa en células de mamífero. Los registros de patch-clamp en la configuración «cell-attached», muestran que los ADT producen una drástica reducción, dependiente de la concentración, de la frecuencia de apertura (aproximadamente $50 \pm 12\%$ a 10 μM) y del tiempo de estado abierto del canal (12 veces a 50 μM). Además, los ADT producen una reducción significativa, dependiente de la concentración, del pico de las corrientes activadas por perfusión rápida de acetilcolina a células que expresan alfa7-5HT[3]. En conclusión, los resultados obtenidos a partir de registros de canal único y de corrientes macroscópicas sugieren que los ADT actúan sobre el receptor alfa7-5HT[3] como bloqueadores lentos de canal abierto, pudiendo el receptor pasar de un estado bloqueado a uno cerrado. Al mismo tiempo los ADT podrían estar actuando sobre el dominio extracelular provocando un aumento en la desensibilización. La comparación de estos efectos con los observados sobre receptores. 5HT[3] permitirá discriminar las acciones de ADT sobre cada dominio. Subs por ANPCyT, UNS y CONICET.

81. (7625) IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DEL SEGMENTO TRANSMEMBRANAL M1 DEL RECEPTOR NICOTÍ-

NICO QUE AFECTAN SU ACTIVACIÓN. CORRADI, JEREMÍAS; SPITZMAUL, GUILLERMO; DE ROSA, MARÍA JOSÉ ; BOUZAT, CECILIA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

El receptor nicotínico (AChR) muscular es un pentámero con una composición $\alpha_2\beta\gamma\delta$. Cada subunidad posee un dominio N-terminal, cuatro segmentos transmembranales (M1-M4), y un dominio C-terminal. Nuestro objetivo fue identificar residuos del segmento M1 que participan en la activación del AChR. Para ello combinamos mutagénesis dirigida y construcción de subunidades quiméricas con registros de patch-clamp. Demostramos que la posición 15' afecta significativamente la cinética de activación. Para las subunidades alfa, epsilon y delta hay una relación inversa entre la eficacia de activación del canal y el volumen del residuo sustituyente en 15', en cambio para beta no existe correlación entre la eficacia de activación y las propiedades fisicoquímicas del residuo. Según la estructura atómica la posición F15' de la subunidad alfa interaccionaría con el residuo L11' en M2. Para determinar cómo esta interacción modifica la cinética intercambiamos los aminoácidos entre ambas posiciones. La probabilidad de apertura aumentó 2 veces en M1 F15'L, disminuyó 6 veces en M2L11'F y 1.8 veces en la doble mutante. Esta reversión del efecto observado sugiere que la interacción entre ambas posiciones es más importante que las propiedades de los aminoácidos individuales que las ocupan. También construimos un AChR muscular quimérico reemplazando el segmento M1 de la subunidad alfa por el de alfa7. Este AChR mostró aperturas 10 veces más largas que el control y una menor constante de disociación del agonista. Para identificar los residuos implicados en dichos cambios realizamos quimeras parciales, y observamos que las posiciones 6', 8' y 9' son las responsables de los principales cambios cinéticos. Nuestros resultados revelan que el segmento M1 tiene un rol funcional, que las posiciones 6', 8', 9' y 15' contribuyen a la activación del canal, y que las bases estructurales de la contribución para la posición 15' no se conservan entre subunidades.

82. (7727) DETERMINACIÓN CITOMÉTRICA DE CFTR, MUC1 Y ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN CÉLULAS CFDE, DERIVADAS DE UN PACIENTE CON FIBROSIS QUÍSTICA. REYES, GLORIA BEATRIZ; TAMINELLI, GUILLERMO LUIS; VALDIVIESO, A.GABRIEL ; DANKERT, MARCELO A.; SANTA COLOMA, TOMÁS A.

IIB-UBA, IIBBA-CONICET y Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires Argentina.

La fibrosis quística (FQ) se caracteriza por una falla del transportador de Cl⁻ CFTR, un aumento de mucus en los conductos epiteliales, e infecciones de las vías respiratorias por Pseudomonas aeruginosa, entre otras alteraciones. Previamente, utilizando display diferencial, encontramos que la proteína cinasa c-Src constituye el puente entre la falla del CFTR y la sobreexpresión de MUC1, principal mucina de las vías respiratorias (J Biol Chem 277: 17239-47, 2002). Ahora determinamos por citometría de flujo los niveles de expresión de las proteínas CFTR y MUC1, en células CFDE (derivadas de un paciente FQ) y CFDE/6RepCFTR (CFDE transfectadas con CFTR wt). Se encontró una menor expresión de CFTR en células CFDE (FQ) con respecto a las CFDE/6RepCFTR. Las células CFDE/6RepCFTR, que expresan abundante CFTRwt, presentaron sólo una pequeña población que respondía a glibenclamida (inhibidor del CFTR, 50 mM, 24 hs) mediante una rápida despolarización mitocondrial (medida con JC1 como dímero); no se observó una respuesta similar en células CFDE. Sin embargo, la glibenclamida sí produjo una notoria despolarización mitocondrial en células epiteliales T84 (CFTRwt), que expresan niveles normales de CFTR, sugiriendo que la actividad mitocondrial podría estar modulada por la actividad del canal CFTR. Por otro lado, MUC1 aumentaba en células CFDE/6RepCFTR incubadas con glibenclamida, pero no se observaron cambios en células CFDE, confirmando los resultados obtenidos anteriormente por microscopía

confocal. Llamativamente, mediante dot-blot, observamos una concentración mucho mayor de MUC1 soluble (shedding) en los sobrenadantes de las células CFDE. Agradecimientos: UBA, CONICET, Beca Carrillo-Oñativía. Los resultados sugieren que la actividad mitocondrial podría estar modulada por la actividad del CFTR. La mayor secreción de MUC1 soluble podría explicar la mayor susceptibilidad de los pacientes a las infecciones bacterianas.

83. (7809) ROL DEL SEGMENTO TRANSMEMBRANAL M3 EN LA ACTIVACION DEL RECEPTOR NICOTINICO. DE ROSA, MARIA JOSE; SPITZMAUL, GUILLERMO; BOUZAT, CECILIA

Instituto De Investigaciones Bioquímicas De Bahía Blanca

El receptor nicotínico (AChR) es un pentámero formado por subunidades homólogas. Cada subunidad posee 4 segmentos transmembranales (M1-M4). Para determinar el rol de M3 en la activación del AChR construimos subunidades quiméricas reemplazando dicho segmento por el de otras subunidades, y evaluamos los cambios funcionales mediante registros de canal único. Cuando M3 de la subunidad alfa1 es reemplazado por el de la subunidad alfa7 neuronal, la duración del canal abierto disminuye significativamente y los tiempos de cierre se prolongan. El análisis cinético revela un descenso de 6 veces en la velocidad de apertura del canal (β) y un incremento de 2 veces en la velocidad de cierre (alfa). Cuando M3 de alfa1 es reemplazado por el de la subunidad epsilon las aperturas se prolongan y la velocidad de cierre disminuye 20 veces. La probabilidad de apertura para este AChR es máxima a 1 μ M ACh. Por el contrario, en la quimera inversa, M3 de alfa en epsilon, los canales son breves y con cierres prolongados, β disminuye 2.5 veces y alfa aumenta 5 veces. También estudiamos los sitios de interacción de M3 con M2, segmento que forma el poro, propuestos a partir de la estructura atómica. Mutamos el aminoácido presente en M2 al existente en M3 y viceversa (alfa L250I-I296L y L257I-I289L) y luego combinamos ambas mutantes para reconstituir el par presente en el AChR salvaje. L250I aumenta 8 veces alfa y disminuye β a la mitad; I296L aumenta 2 veces alfa. La mutante doble (L250I+I296L) revierte β a su valor normal a la vez que atenúa la disminución de alfa ocasionada por las mutaciones individuales. L257I e I289L afectan solamente alfa elevándola 3.6 y 2 veces, respectivamente. La combinación de ambas presenta una población de cinética semejante a la salvaje y una de canales breves. Nuestros resultados revelan que el segmento M3 contribuye a la activación del AChR y que su contribución es específica para cada subunidad. Además proveen evidencia experimental acerca del rol de las interacciones de M3 con M2 en el gatillado del AChR.

84. (7960) ESPECIFICIDAD DEL TRANSPORTE DE CATIONES POR LA PMCA. JAITOVICH, MARIA DEL MAR; ROSSI, JUAN PABLO FC

Facultad de Farmacia y Bioquímica

La Ca(2+) ATPasa de membrana plasmática (PMCA) de eritrocitos humanos cataliza el transporte de Ca(2+). Se ha sugerido que puede transportar otros metales divalentes (Olson y Cazort, 1969; Pflieger y Wolf, 1975). El transporte es activado por calmodulina (CaM). Es conocido que CaM puede unirse a otros metales como el Pb(2+) (Kern y col. 2000). Dado que Ca(2+) contamina las sales en concentración suficiente para catalizar la PMCA, es difícil determinar la especificidad del transporte de PMCA por otros cationes. Estudiamos la capacidad de hidrólisis del ATP por PMCA con una serie de divalentes midiendo la actividad enzimática con y sin CaM, en ausencia y presencia de Ca(2+) contaminante. Las membranas de eritrocitos fueron incubadas con 50 uM de divalente y se determinó el Pi producido (Fiske-Subbarow). Además del Ca(2+), el Ba(2+) y en menor proporción Mn(2+) > Ni(2+) > Co(2+) > Cu(2+) = Pb(2+) > Sr(2+) > Sn(2+) > Fe(2+) pueden estimular la ATPasa. Por el contrario Zn(2+) y Cd(2+) inhiben la actividad. Para evaluar si la activa-

ción de PMCA puede deberse a la interacción de CaM con el catión, estudiamos la capacidad de unión de CaM a dichos cationes utilizando la sonda 8-anilino-1-ácido naftalenosulfónico (ANS). Al unirse con un metal adecuado CaM sufre un cambio conformacional, expone sitios hidrofóbicos que interactúan con ANS emitiendo fluorescencia (da Silva y col. 2001). La excitación del complejo CaM-ANS- divalente se realizó a 368 nm y se registró la emisión entre 370 y 570 nm. Se tituló la unión al complejo mediante agregado de EGTA. Los resultados preliminares muestran que Ca(2+) y Ba(2+) se unen al complejo CaM-ANS, con una Kd de 0.493 \pm 0.066 uM y 11.93 \pm 4.52 uM respectivamente. Estos resultados sugieren que PMCA puede ser activada no solo por Ca(2+), sino también por otros cationes divalentes, directamente o a través de su interacción con CaM.

ENFERMEDADES NO INFECCIOSAS: ESTUDIOS BÁSICOS, CLÍNICOS Y PATOLOGÍA

85. (6856) ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES DE POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE Y DE CELULAS ASOCIADAS AL MISMO, EN BOVINOS INTOXICADOS CON SOLANUM GLAUCOPHYLLUM (SG). FONTANA, PAULA (1); LAGUENS, GRACIELA (2); BARBEITO, CLAUDIO (1); DI GIROLAMO, WANDA (2); COSTA, ENRIQUE (1); CORONATO, SILVIA (2); GIMENO, EDUARDO (1); PORTIANSKY, ENRIQUE (1)

(1) Instituto de Patología. FCV. UNLP. (2) Cátedra de Patología B. FCM. UNLP.

La calcinosis enzoótica es una intoxicación crónica provocada por la ingestión de plantas calcinogénicas que poseen glucósidos del 1,25 dihidroxi-vitamina D[3]. La vitamina D[3] tiene acción inmunomoduladora. Nuestro objetivo fue determinar la respuesta del sistema inmune de bovinos ante la ingestión de SG. Vaquillonas cruzas (n =10) recibieron 50 g de hojas molidas, repartidas en 2 tomas semanales, durante 15, 30 o 60 días. Los animales fueron sacrificados de a pares al final del período de intoxicación. Un grupo fue intoxicado durante 15 días pero sacrificado a los 60 días pi (E1560). Los controles se sacrificaron al día 0 y 60 pi. De todos los animales se extrajeron macrófagos peritoneales para las pruebas de fagocitosis. Los linfocitos subilíaco y cervical superficial fueron procesados en fresco o incluidos en parafina, respectivamente. De los primeros se extrajeron células dendríticas para la inmunomarcación con anticuerpos monoclonales anti S-100. Cortes de 5 μ m se tiñeron con HE o con inmunomarcación para S-100 y se analizaron morfométricamente. La actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales disminuyó progresivamente en los animales intoxicados. Histológicamente se observó una reducción del área paracortical por expansión de los centros germinativos con numerosos macrófagos con cuerpos tingibles y dilatación de los senos medulares. En la inmunomarcación de células dendríticas aisladas y de cortes de tejidos se observó una reducción significativa de las mismas con respecto a los controles de 29,92% a los 15 días pi, 60,40% a los 30 días pi y 73,57% a los 60 días pi. Los animales E1560 mostraron una reducción del 29,98%. Los resultados del presente trabajo demuestran que la intoxicación con SG genera alteraciones estructurales y funcionales del sistema inmune y de las células relacionadas con el mismo.

86. (7010) EFECTO INSULINOMIMÉTICO DEL VANADATO SOBRE LA BIOSÍNTESIS DEL HEMO. GEREZ, ESTHER; OLIVERI, LEDA; VAZQUEZ, ELBA (1); BATLLE, ALCIRA

CIPYP-CONICET. (1) Departamento de química Biológica

En los ataques agudos de porfiria el tratamiento con hidratos de carbono reduce rápidamente la producción y excreción de precursores del hemo tales como el ALA. Se ha demostrado en roedores y embriones de pollo que la glucosa inhibe o previene la inducción de la enzima ALA-S. A pesar de su aplicación tera-

peútica y de los numerosos estudios realizados en porfiria experimental, las bases bioquímicas y moleculares del así llamado «efecto glucosa» aún no han sido dilucidadas. In vitro se ha demostrado que la insulina tiene un efecto negativo sobre la transcripción del ALA-S. Para estudiar los mecanismos que subyacen a las acciones observadas de la glucosa e insulina se utilizaron ratones machos de la cepa CF1 (20 g, n=6) diabetizados con una única dosis de STZ (170 mg/Kg ip). La diabetes se confirmó a los 16 días de iniciado el tratamiento y los animales con niveles de glucosa en sangre mayores a 300 mg/ml se separaron en dos grupos. El grupo STZ no recibió tratamiento adicional. El grupo STZ+V recibió el agente hipoglucemiante vanadato (V: 0,2 mg/ml en el agua de bebida) durante 16 días. A los 32 días de iniciado el tratamiento, en los animales diabéticos (grupo STZ) la glucosuria alcanzó 800 mg/ml, la expresión del ARNm del ALA-S hepática aumentó un 80 %, sin embargo la actividad de la enzima no estaba aumentada (VC:0,220 U/mg \pm 0,156, VT:0,156 \pm 0,055). El tratamiento con vanadato (grupo STZ+V) normalizó la glucemia y los niveles de ARNm, pero la actividad de la enzima disminuyó alcanzando valores menores al 45% (VC:0,220U/mg \pm 0,156, VT:0,122U/mg \pm 0,059, p<0,05). En los animales controles que sólo recibieron V, no se modificaron los niveles de glucosa, mientras que el ARNm se encontró aumentado en un 40% y la actividad de la enzima disminuida en un 40% (VC:0,220U/mg \pm 0,156, VT:0,139U/mg \pm 0,032, p<0,05). El vanadato restablece la regulación a nivel transcripcional del ALAS, pero también ejerce efectos adicionales a nivel postranscripcional.

87. (7230) QUIMIOLUMINISCENCIA IN VIVO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE GLAUCOMA. FERREIRA, SANDRA MARÍA; LERNER, FABIÁN; EVELSON, PABLO ANDRÉS; LLESUY, SUSANA FRANCISCA

Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.B.A.

El glaucoma es una neuropatía óptica multifactorial caracterizada por la pérdida progresiva de células ganglionares retinales y atrofia del nervio óptico. Actualmente la presión intraocular es considerada un factor de riesgo y los mecanismos propuestos del daño incluyen: isquemia, falta de factores tróficos, estrés oxidativo y excitotoxicidad. La medida de quimioluminiscencia in vivo es utilizada como un marcador temprano de daño oxidativo. El objetivo del trabajo fue evaluar los cambios en la quimioluminiscencia in vivo (QL) y en la presión intraocular a distintos tiempos en un modelo de glaucoma experimental. El modelo de glaucoma se llevó a cabo mediante la cauterización de dos de las cuatro venas episclerales del ojo izquierdo de acuerdo a lo descrito por McGovern, el ojo derecho fue utilizado como control. La presión intraocular fue medida con un Tonopen XL. La quimioluminiscencia in vivo se midió en un contador de fotones Johnson Foundation. Los resultados se expresan en cuentas por segundo (cps) por cm (2) de superficie. Luego de la cirugía la presión intraocular para el ojo izquierdo fue 28,7 \pm 1,7 mmHg mientras que para el derecho 9,0 \pm 0,4 mmHg, estas presiones se mantuvieron a lo largo de todo el período de evaluación. Al día 15 la QL decayó en un 50% y a los 30 días un 30 % con respecto al ojo control. Sin embargo a los 60 días se observó un aumento significativo de un 23% de la QL en el ojo izquierdo. Estos resultados sugieren que en los estadios tempranos del glaucoma el daño oxidativo podría ser compensado por los antioxidantes endógenos presentes en altas concentraciones en el ojo. El aumento en la QL a los 60 días sería una consecuencia de la disminución de las defensas antioxidantes. La QL es un método no invasivo, podría ser utilizado para monitorear el daño oxidativo en el glaucoma. Con una mejor comprensión de la fisiopatología del glaucoma será posible que existan nuevos objetivos de tratamiento y terapias asociadas al tratamiento convencional para proteger el nervio óptico.

88. (7242) PROTOPORFIRIA EXPERIMENTAL: EFECTO DE ACIDOS BILIARES SOBRE EL DAÑO HEPATICO INDU-

CIDO POR GRISEOFULVINA. MARTÍNEZ, MARÍA DEL CARMEN; BATLLE, ALCIRA; AFONSO, SUSANA

Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porphirias (CIPYP) - CONICET - FCEN - UBA

La administración oral de Griseofulvina (Gris) a ratones produce un gran desbalance redox en el hígado debido a la acumulación de porfirinas. La principal ruta de eliminación de las porfirinas hidrofóbicas es la vía biliar. Gris induce la disminución del flujo biliar paralelo al aumento de porfirinas acumuladas. Se ha observado que la Protoporfirina (PP) impide la secreción biliar de fosfolípidos y colesterol, pero no de ácidos biliares. Los procesos de eliminación de lípidos y PP están acoplados, por lo que la excreción de porfirina está disminuida. Se investigó, entonces, si la administración de ácidos biliares dehidrocólico, quenodioxícólico, desoxicólico y ursodeoxicólico, que aceleran la excreción biliar de porfirinas, reducía el daño hepático causado por Gris. Por administración de Gris sola se observó elevada actividad de Glutathion reductasa (GRed) (144%, p<0,01), Superóxido dismutasa (167%, p<0,01), Fosfatasa alcalina (FAlc) (147%, p<0,01), gamma-GT (130%, p<0,01) y GST (133%, p<0,01), y aumento de los niveles de porfirinas totales (155%, p<0,01), glutathion (GSH) (142%, p<0,01) y P450 (130%, p<0,01). El ácido desoxicólico (DX) redujo la acumulación de porfirinas inducida por Gris, el GSH (VN 25,47 \pm 4,58 nmol/mg) se mantuvo en los valores control, aunque se elevó la actividad de GRed (150%, p<0,01). La actividad de las enzimas hepáticas gamma-GT y FAlc (VN 11,04 \pm 1,89 U/mg; 8,61 \pm 3,55 U/mg) no se elevó tras la administración de DX+Gris; tampoco se observó aumento de peroxidación lipídica. La actividad de GST (VN 6,41 \pm 0,87 μ mol/mg) y el contenido microsomal de P450 (VN 0,162 \pm 0,063 nmol/mg) no fue alterado por la administración de DX+Gris. Los resultados obtenidos indicarían que el ácido desoxicólico previene, al menos parcialmente, el daño hepático inducido por Gris. Este ácido biliar sería un candidato preliminar para combinar con antioxidantes, para evitar el efecto nocivo de las porfirinas acumuladas en hígado.

90. (7518) RIESGO DE SOBREPESO Y OBESIDAD EN NIÑOS MENORES DE 8 AÑOS. PONCE, GRACIELA M (1); FAJARDO, MARÍA A (1); RODRIGUEZ, PATRICIA N (2); BERMÚDEZ, ENRIQUE F (2); SEBASTIÁN, GABRIEL (1); BARRIONUEVO, LILIANA (1); ORTIZ, SUSANA (1); FRIEDMAN, SILVIA M (2)

Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. (1) Facultad de Ciencias Naturales, UNPSJB. (2) Cátedra de Bioquímica General y Bucal, FOUBA.

La obesidad es una enfermedad de etiología multifactorial y de evolución crónica. Su prevención desde la niñez debe ser una prioridad estratégica en salud, especialmente por el riesgo de persistencia en la edad adulta, donde se asocia a las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). Se estudiaron dos grupos de niños de edades comprendidas entre 2 y 8 años, clínicamente sanos, que concurren a un centro de promoción barrial de la provincia de Chubut (CHU) (n=62) o a un jardín integral de la provincia de Buenos Aires (BA) (n=82), con el objetivo de detectar frecuencia de sobrepeso y obesidad para talla normal. Se midieron el peso y la talla expresándose como puntaje Z de peso para la talla y talla para la edad (ZPT y ZTE respectivamente), se calculó el índice de masa corporal (IMC) (kg/m²) y peso relativo (Pr), se midió la composición corporal (% grasa y % magra) por bioimpedancia y se extrajo sangre para la determinación sérica de fosfatasa alcalina total y ósea (FAT y FAO). Resultados: de acuerdo al ZPT >1.28, la frecuencia fue para CHU =12.9% (12.9% > 1.88) y BA = 12.2% (8.5% entre 1.28 y 1.88 y 3.7% >1.88). El IMC (media \pm DE) CHU = 21.4 \pm 3.5 y BA = 18.0 \pm 0.6 (p<0.02); el Pr CHU =135.5 \pm 22.0 y BA = 114.8 \pm 2.4 (p<0.02); el % de grasa CHU = 31.9 \pm 5.7 y BA = 23.4 \pm 4.3 (p<0.005), el % magra CHU = 24.4 \pm 2.2 y BA = 25.8 \pm 1.4 (p>0.05). No se encontraron DS entre las FAT y FAO de ambos

grupos ($p>0.05$). El IMC se encontró elevado en un 40 % para CHU y 20 % para BA respecto a los valores esperados para la edad y con alta correlación con el % de grasa corporal. Estos datos sugieren la necesidad de intervención nutricional temprana para prevenir riesgo de ECNT en la edad adulta.

91. (7980) EFECTO A CORTO PLAZO DE DIETAS HIPERGRASAS SOBRE EL PERFIL LIPIDICO-LIPOPROTEICO. MACRI, ELISA (1); SUAREZ, CRISTINA(1); ZAGO, VALERIA (2); RODRIGUEZ, PATRICIA (1); SCHREIER, LAURA (2); FRIEDMAN, SILVIA (1)

Cátedra De Bioquímica-FOUBA. (1) Cat. de Bioquímica, FOUBA (2)Lab Lípidos y Lipoproteínas, Dto Bioq Clín, FFyB-UBA

Existe incremento en el uso de dietas hipergrasas con fines terapéuticos. El objetivo fue evaluar crecimiento corporal y riesgo aterogénico a corto plazo de dietas con diferente fuente grasa. Ratas Wistar macho ($n=50$) al destete fueron divididas en 5 grupos, cada uno recibió una de 4 dietas ad libitum durante 4 semanas: control (AIN-93)(C), soja(S), maíz(M), lino(L) y vaca(V). La relación calórica hidratos de carbono/proteína/grasa en S, M, L y V fue 32/14/54 vs 66/18/16 en C. Se pesaron y midieron periódicamente, se calcularon velocidades de ganancia de peso (VGP g/100g rata) y de longitud (VGL cm/10 cm rata). Se registró el consumo expresado en Cal/100 g rata. A las 4 semanas se extrajo sangre por punción cardíaca para determinar en mg/dl: colesterol (COL) triglicéridos (TG), COL-HDL y COL-NO-HDL indicador de lipoproteínas aterogénicas con apoB y los resultados fueron (media±DE): ANOVA-Test de Dunnett, # Student-Newman-Keuls (**# $p<0.05$, **/# $p<0.01$)

	Control	Soja	Maíz	Lino	Vaca
Consumo	54.6 ± 2.9	50.5 ± 4.9	51.6 ± 6.6	50.4 ± 5.7	56.7 ± 3.1
VGP	33.8 ± 3.2	32.3 ± 1.8	32.8 ± 2.3	32.2 ± 0.6	32.0 ± 1.3
VGL	1.42 ± 0.08	1.26 ± 0.11	1.27 ± 0.15	1.25 ± 0.07	1.78 ± 0.10** (##)
COL	76.6 ± 8.3	64.8 ± 5.5	83.2 ± 23.1	53.2 ± 11.4*(#)	91.6 ± 5.2(#)
TG	104.4 ± 22.1	44.2 ± 11.7	58.4 ± 20.5	50.0 ± 21.0	163.2 ± 77.2(#)
C-HDL	52.6 ± 7.3	47.0 ± 5.4	66.0 ± 22.8	33.2 ± 6.4*(#)	53.6 ± 4.0
COL-NO-HDL	24.0 ± 7.6	17.8 ± 5.2	17.2 ± 8.1	20.0 ± 2.5	38.0 ± 5.3** (##)

No se observó diferencias en el consumo, VGP y VGL, excepto para V que además presentó aumento de TG y COL-NO-HDL. Se deduce que dietas ricas en grasas saturadas inducen a corto plazo un perfil lipídico-lipoproteico aterogénico

92. (8039) EFECTO DEL CONSUMO CRONICO-CRECIMIENTO Y CICLO REPRODUCTIVO- DE DIETAS BAJAS EN GRASA Y/O CALCIO SOBRE LA COMPOSICION CORPORAL. SUÁREZ, CRISTINA(1); FERREIRA, ANDREA(1); MACRI, VANESA(1); ZENI, SUSANA(2); RODRIGUEZ, PATRICIA(1); FRIEDMAN, SILVIA(1)

(1) Cat. Bioquímica. FOUBA. (2) Osteopatías Médicas. Hosp. Clínicas. Fac. Medicina. UBA

Animales alimentados con dietas isocalóricas cuya única variable era el reemplazo de lípidos(L) por hidratos de carbono(HC), relación calórica HC:L=3:1 desde el destete hasta los 50 días de edad presentaban una correlación positiva entre grasa dietaria y grasa corporal. El objetivo fue estudiar, en un modelo experimental en rata, el efecto del consumo crónico de dietas bajas en calcio y/o grasa sobre la composición corporal desde el destete hasta el ciclo reproductivo. 40 ratas Wistar hembras se alimentaron desde el destete con una de 4 dietas cuya relación calórica HC:L fue 1:1 ó 3:1 y contenido de calcio 0.6% ó 0.3%. 20 se aparearon a los 70 días de edad y se evaluaron las madres y sus crías ($n=56$). Se determinó porcentaje de grasa corporal (método químico) a los 35 y 49 días de edad y al destete en madres y crías (T35, T49, TfM y TfC respectivamente). Los resultados (media±DE) fueron: ANOVA-Test de Dunnett, Control 1:1-0.6 (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

Dieta	T35	T49	TfM	TfC
1:1-0.6	10.55±1.48	11.74±1.69	10.72±4.71	14.84±2.2
1:1-0.3	10.40±2.21	11.53±0.99	4.85±2.76*	11.06±2.2**
3:1-0.6	8.53±1.48*	10.76±1.68	3.68±1.21*	8.82±1.7**
3:1-0.3	5.56±0.86**	8.8±2.95*	4.92±2.09*	9.19±1.94**

El reemplazo de grasa por hidratos de carbono en la dieta lleva a una disminución, a corto plazo, de la grasa corporal, siendo más significativa cuando se suma el efecto de la restricción de calcio. A largo plazo el impacto sobre la disminución de grasa corporal se visualiza aún sin restricción de grasa en la dieta. Dada la importancia de los lípidos corporales es necesario ampliar los estudios sobre el impacto de la disminución de los mismos en el desarrollo puberal y esquelético. UBACyT O-003 y O-004.

93. (8077) PORFIRIA CONGENITA ERITROPOYETICA. ESTUDIOS BIOQUIMICOS. PARERA, VICTORIA ESTELA; ROSSETTI, MARIA VICTORIA; MELITO, VIVIANA ALICIA; BATLLE, ALCIRA

Departamento De Quimica Biologica, FCEN-UBA. CIPYB-CONICET

La Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE) es una rara enfermedad autosómica recesiva, de la cual hay menos de 200 casos publicados. La PCE se produce por una actividad disminuida de la Uroporfirinógeno III Sintetasa (Uro III-S), que cataliza la formación del Uroporfirinógeno III, isómero fisiológico de la biosíntesis del hemo. En la PCE se acumulan grandes cantidades del isómero correspondiente a la serie I, que se oxida a Uroporfirina I (Uro I) y provoca la lisis de los glóbulos rojos liberando grandes cantidades de Uro I que se excretan por orina y materia fecal. Las manifestaciones clínicas, que incluyen lesiones cutáneas severas en zonas expuestas que pueden llevar a la mutilación de los tejidos, hipertricosis, alopecia, eritrodancia, se presentan generalmente desde el nacimiento. Sin embargo hay 12 casos reportados de manifestación tardía. En este trabajo se presentan 3 casos de PCE infantil y 1 caso de manifestación tardía en un paciente de 55 años. La excreción de porfirinas urinarias varió entre 37.000 y 59.500 µg/24 h (VN: hasta 250 µg/24 h). Las porfirinas fecales variaron entre 880 y 5.250 µg/g (VN: hasta 130 µg/g) y las porfirinas plasmáticas (IPP) entre 5,80 y 11,50 (VN: hasta 1,30). El análisis de las porfirinas urinarias por HPLC reveló un patrón compatible con PCE (96-98% Uro I – 2-4% Uro III). La actividad de URO III-S medida en un caso infantil y en el adulto reveló que la capacidad de la enzima para convertir el isómero tipo I en el III está disminuida entre un 25 - 44%, valor mayor al esperado por tratarse de una enfermedad autosómica recesiva. Sin embargo, estos resultados se corresponden con la manifestación clínica leve observada en estos 2 pacientes. En este trabajo presentamos el primer caso de PCE en adultos. Si el fenotipo observado en estos pacientes se correlacionara con las mutaciones en el gen de la UROIII-S responsables de alterar la actividad enzimática, la medición de esta enzima sería de suma importancia para establecer el pronóstico de la PCE en cada individuo.

FARMACOLOGÍA 1: NEUROFARMACOLOGÍA

94. (6650) LA RADIACIÓN IONIZANTE NEONATAL INDUCE ALTERACIONES EN LAS ACTIVIDADES DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA Y PKC EN EL CEREBELO EN DESARROLLO. NEUROPROTECCIÓN PARCIAL POR UN TRATAMIENTO CON 17-BETA-ESTRADIOL. ZORRILLA ZUBILETE, MARÍA (1); SILBERMAN, DAFNE M. (2); GUELMAN, LAURA R. (1); RÍOS, HUGO (3); GENARO, ANA M. (2); ZIEHER, LUIS M. (1)

Primera Cátedra Farmacología, Facultad de Medicina, UBA. (2)CEFYBO-CONICET, (3) Instituto de Biología Celular y Neurociencias

La interacción de la radiación ionizante con el Sistema Nervioso Central en desarrollo puede generar cambios plásticos. El óxido nítrico (NO) sintetizado por la NO sintasa (NOS) cumple un importante rol en el control de la actividad neuronal. Por otra parte, la PKC es una de las enzimas vitales para el normal desarrollo neuronal y podría ser blanco del daño por radiaciones ionizantes. Los estrógenos promueven la sobrevivencia celular, la plasticidad sináptica y previenen el «podado» axonal. Teniendo en cuenta estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue evaluar las alteraciones motoras, estructurales y bioquímicas inducidas por la exposición neonatal a radiaciones ionizantes y el posible efecto neuroprotector del 17- β -estradiol. Se observó un déficit motor en los animales irradiados (I) evaluado en la adultez del animal mediante el test de las huellas (Control (C)= 0.39 \pm 0.06 cm; I=0.86 \pm 0.07 cm). Cambios en la citoarquitectura del CE de animales irradiados. Aumento en la actividad de PKC (C=103 \pm 15; I=305 \pm 10 en pmol/min/g tej.). Disminución en la actividad catalítica de la NOS constitutiva (C=1234.9 \pm 68; I=433.4 \pm 32 en pmol/citrulina/g tej.) y un aumento de la actividad de iNOS a largo plazo (C=29.8 \pm 1.9; I=2824.1 \pm 99.1). Un tratamiento con 17- β -estradiol permite restaurar algunos de los parámetros alterados permitiendo que el trastorno motor sea menor (I+Trat= 0.42 \pm 0.02) y que la citoarquitectura del cerebelo irradiado y tratado con dicho antioxidante se asemeje a un cerebelo de un animal control. La evidencia aquí presentada indicaría que las radiaciones ionizantes modifican la actividad de NOS y PKC que podría correlacionarse con el déficit motor observado en la vida adulta. El 17- β -estradiol ejerce un efecto neuroprotector parcial que podría ser de utilidad para incorporarse como coadyuvante en las terapias neuroprotectoras actuales.

95. (7035) EFECTO DEL ESTRÓGENO FRENTE A LA ACCIÓN NEURODEGENERATIVA DEL MK-801. DE OLMOS, SOLEDAD; ORTIZ, CECILIA; DE OLMOS, JOSÉ SEVERO

INIMEC. Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

El MK-801 es una antagonista no competitivo del receptor glutamatérgico NMDA(A-NMDA). El bloqueo de los receptores NMDA produce la liberación desinhibida de glutamato (HiperGlu) y acetilcolina (hiperAChE) en el cerebro. La hipofunción del receptor NMDA(HipoNR) causada por los A-NMDA conduciría a la sobre-estimulación de las neuronas pos-sinápticas y ello podría explicar los estados conductuales y cognitivos alterados inducidos por tal desinhibición a la manera de lo que ocurriría en algunas enfermedades neurológicas. Si la HipoNR es severa, aparece un cuadro de neurotoxicidad con muerte neuronal. Puesto que la sensibilidad ante los A-NMDA no sería igual en machos que en hembras, adquiere importancia valorar la magnitud del dimorfismo neurotóxico desencadenado por esta HipoNR. A tal efecto es primordial determinar si las hormonas esteroideas sexuales contribuyen al mismo. Como herramienta para tal evaluación se utilizó la tinción de la degeneración neuronal inducida por MK-801 con la técnica Amino-Cupro-Argéntica. El efecto hormonal se evaluó en ratas machos (M) y hembras(H) enteras y castradas (MC y HC), las que fueron tratadas con CIna, estrógeno (E), propionato de testosterona (TP) o dihidrotestosterona (DHT) por 3 días previos al tratamiento de MK-801 (5 mg/kg). Todos los animales fueron sacrificados a las 72 hrs. La magnitud de la muerte neuronal resultante traducida en fuerte argirofilia somática se determinó a través de su conteo en corteza retrosplenial, corteza entorrinal y girus dentado, áreas supersensibles a los A-NMDA. Se confirmó que las H son mas sensibles que los M. Los MC son tan sensibles como las H o HC. Tratamiento con TP y DHT disminuye la toxicidad en M. E aumenta la sensibilidad en M y MC. DHT protege en HC pero no tanto en H. Conclusión: las hormonas masculinas muestran efectos protectores mientras que las femeninas sensibilizarían frente a la acción del A-NMDA en estas áreas corticales. Esto indicaría que existe una interacción de los esteroides sexuales con los receptores-NMDA influyendo así en su mecanismo de acción.

96. (7204) ESTUDIO CINÉTICO DE LOS TRANSPORTADORES DE [3H]-GABA Y [3H]L-SERINA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL. CHELUJA, MG; SCOLARI, MJ; CAMARGO, JM; BLAKE, MG; BOCCIA, MM; ACOSTA, GB

ININFA - CONICET Cátedra de Farmacología, FFyB, UBA, Junín 956 5º piso

Los aminoácidos neuroactivos tienen un papel preponderante en la transmisión sináptica en el sistema nervioso central (SNC). En los cerebros inmaduros, algunos aminoácidos tienen una función totalmente diferente que en los adultos. Mientras que los mecanismos relacionados con la actividad neuronal del GABA han sido bien estudiados, se ha prestado poca atención a la L-serina, un aminoácido no esencial, que actúa como factor neurotrófico. Se analizó la actividad de los transportadores de GABA y serina, estudiando su actividad en sinaptosomas de corteza cerebral de rata durante diferentes estadios postnatales y se la comparó con la del adulto. Se utilizaron ratas macho Wistar adultos (180-200 g) y neonatos de 5, 7, 13 y 21 días de edad. Las preparaciones fueron incubadas con 10 nM de [3H]-Serina y [3H]-GABA en presencia del ion sodio a 30°C. Se determinaron los parámetros cinéticos Vmax y Km. En la captación de Serina, la velocidad máxima fue significativamente mayor a los 5, 7 y 21 días comparada con la del grupo control. La afinidad fue significativamente menor sólo a los 21 días comparada con la del grupo control. En la captación de GABA se observó la mayor velocidad máxima a los 7 días, mientras que la afinidad fue significativamente menor a los 5, 7 y 21 días, comparadas con el grupo control. Las variaciones observadas en la actividad de estos dos transportadores aminoacidérgicos en el SNC estarían, al menos en parte, relacionadas con la maduración de las estructuras sinápticas vinculadas con el desarrollo del SNC.

97. (7216) EFECTO DEL ESTRÉS POSTNATAL SOBRE LA CAPTACIÓN DE [3H] - GABA Y [3H]L- SERINA EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. SCOLARI, MARIANO; CHELUJA, MG (1); BLAKE, MG (2); BOCCIA (2), MM; ACOSTA, GB (1)

Instituto de Investigaciones Farmacológicas. (2) Cat. de Farmacología-FFyB-UBA

La exposición a diferentes factores estresantes durante los primeros días de vida postnatal produce alteraciones en la conducta y en parámetros bioquímicos. El activo desarrollo del tejido neuronal ocurre en las ratas durante las primeras cuatro semanas postnatales y está asociado con cambios significativos en los niveles de aminoácidos. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio y cumple una función esencial en el control de excitabilidad neuronal y en el procesamiento de la información. La L-Serina, un aminoácido no esencial, actúa como factor neurotrófico y es requerido para la supervivencia neuronal. Ambos aminoácidos son captados por transportadores de membrana cuya actividad depende de la temperatura y de la presencia de iones. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto del estrés por frío en la actividad del transportador de [3H] L-Serina y [3H] GABA en sinaptosomas de corteza cerebral en diferentes estadios del desarrollo postnatal. Se utilizaron ratas macho Wistar de 5, 7, 13 y 21 días de edad, divididas en 2 grupos: el grupo control y el grupo estresado (exposición única a 4 °C durante 20 min). Los animales fueron sacrificados por decapitación inmediatamente después de la sesión de estrés. Se obtuvieron los sinaptosomas que se resuspendieron en un buffer Krebs Ringer Na⁺/K⁺. Se determinó el curso temporal, la dependencia de la temperatura y los requerimientos iónicos. El estrés por frío no modificó la dependencia iónica y térmica; sin embargo disminuyó la actividad de los dos transportadores estudiados comparado con los animales controles. Estos resultados sugieren una posible relación entre el estrés inducido por frío y el funcionamiento de los transportadores de [3H] L-Serina y [3H] GABA en todos los estadios postnatales estudiados.

98. (7239) LA ADMINISTRACIÓN DE CLOZAPINA ALTERA LA INHIBICIÓN DE LA Na⁺,K⁺-ATPASA PRODUCIDA POR NEUROTENSINA. LÓPEZ ORDIERES, MARÍA GRACIELA; R DE LORES ARNAIZ, GEORGINA

Catedra de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Instituto de Biología Celular y Neurociencias «Prof. E. De Robertis». Facultad de Medicina. UBA.

En estudios previos hemos demostrado que el tridecapéptido neurotensina (NT) inhibe la actividad de Na(+), K(+)-ATPasa neuronal, a través del receptor de NT de alta afinidad (NTS1), efecto totalmente bloqueado por la administración de haloperidol. El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de un antipsicótico atípico, la clozapina, sobre la inhibición de la actividad de Na(+), K(+)-ATPasa producida por la NT. Para tal fin, lotes de 5 ratas fueron administrados por vía i.p. con clozapina 10 mg/kg o vehículo; luego de 18 hs, los animales fueron sacrificados y sus cerebros disecados. La corteza cerebral y el cuerpo estriado fueron removidos y homogeneizados al 10% P/V en sacarosa 0.32 M. Los homogeneizados se sometieron a centrifugación diferencial y posteriormente en gradiente de sacarosa para obtener la fracción de las membranas sinaptosomales. La actividad de Na(+), K(+)-ATPasa disminuyó 44% en las membranas de la corteza cerebral y 30% en las membranas del cuerpo estriado de ratas inyectadas con vehículo, por la presencia de 3.5 x 10(-6)M de NT. En las membranas obtenidas luego de la administración de clozapina, el agregado de 3.5 x 10(-6)M produjo un aumento de 26% en la actividad de Na(+), K(+)-ATPasa de membranas de corteza cerebral pero una inhibición de 25% en la enzima de cuerpo estriado. Los resultados mencionados provenían de 4-6 experimentos y las diferencias fueron estadísticamente significativas. Por otra parte, el agregado de clozapina en una concentración 1 x 10(-6)M en experimentos in vitro, no modificó la inhibición de la actividad de Na(+), K(+)-ATPasa producida por la NT, lo que estaría descartando que este antipsicótico ejerce algún efecto directo sobre la enzima y/o sobre los receptores a la NT. Estos hallazgos demostrarían que el efecto de la NT sobre la actividad de Na(+), K(+)-ATPasa neuronal difiere según el tipo de antipsicótico administrado y que los resultados ofrecerían una explicación alternativa para los particulares efectos adversos producidos por estos agentes.

99. (7343) INTERACCIÓN ENTRE UN FLAVONOIDE NEUROACTIVO, LA HESPERIDINA, Y UNA BENZODIAZEPINA CLÁSICA. FERNÁNDEZ, SEBASTIAN P.; WASOWSKI, CRISTINA; PALADINI, ALEJANDRO C.; MARDER, MARIEL

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, FFyB, Junín 956, (C1113) Buenos Aires, Argentina

Antecedentes: Desde 1990 nuestro grupo de investigación ha demostrado la importancia de los flavonoides en el control de la ansiolisis y/o la sedación lo cual ha permitido clasificarlos en dos grupos: 1) flavonas sustituidas, naturales o sintéticas, con afinidad por el sitio de unión a benzodiazepinas (su-BDZ) en el receptor GABA[A]; 2) flavonoides glicosilados sin afinidad por el su-BDZ, con propiedades sedativas e inductoras del sueño in vivo. Hemos identificado, además, en extractos de valeriana a la 6-metilapigenina (MA) miembro del primer grupo mencionado, y dos derivados glicosilados, la hesperidina (HN) y la linarina (LN). La MA no es un compuesto inductor del sueño pero su inyección conjunta con la HN en ratones produce un aumento dramático de la actividad hipnótica. Objetivos: Estudiar la interacción entre la HN y el diazepam (DZ) en ratones. Materiales y métodos: Ensayo de campo abierto con agujeros para evaluar efectos sedativos de inyecciones i.p. de HN, DZ y sus combinaciones. Obtención de curvas dosis-respuesta y cálculo de DE[50]. Análisis isobolográfico de la interacción HN/DZ. Estudio farmacocinético de los niveles plasmáticos de DZ, solo y co-inyectado con HN. Resultados: En el isoblograma los puntos experimentales de las combinaciones HN/DZ 13/1 y 4/1 se ubicaron debajo de la línea aditiva teórica (p < 0.05), y sus índices de

interacción (β) indicaron un aumento de la potencia sedativa de 2 a 1.3 veces ($0.52 < \beta < 0.75$). Los resultados farmacocinéticos mostraron que no existe una variación de los parámetros del DZ al ser co-administrado con HN (p > 0.05). La co-administración de HN y DZ produce una potenciación de efectos sedativos. Esta interacción sinérgica se ejerce a nivel central y no es farmacocinética. Estos efectos pueden utilizarse para mejorar la terapia con benzodiazepinas en humanos.

100. (7344) CURSO TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD DE GSH REDUCTASA EN CEREBELOS DE RATAS IRRADIADAS AL NACIMIENTO. SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE GSH. DI TORO, PATRICIA; DI TORO, CECILIA G.; ZIEHER, LUIS M.; GUELMAN, LAURA R.

1ª Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA

La exposición de ratas neonatas a radiaciones ionizantes induce daño celular, principalmente a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El glutatión (GSH), un antioxidante endógeno, es capaz de neutralizar los ROS a través de su oxidación a GSSG, el cual puede ser nuevamente reducido a GSH en un proceso mediado por la enzima GSH reductasa (GSHr). El objetivo de este trabajo fue confirmar la participación de la GSHr en la generación de los cambios observados en los niveles de GSH luego de la injuria por radiación. Ratas Wistar fueron irradiadas en su extremidad cefálica con 5 Gy de radiación gamma dentro de las 48 hs desde el nacimiento, fueron decapitadas y sus CE fueron disecados. Los niveles de GSH y de GSHr fueron determinados 1 hora, y 1, 20, 30 y 90 días luego de la irradiación. Los resultados muestran que la caída inicial en los niveles de GSH (día 1) no se acompaña de una caída en la actividad de GSHr por mg de tejido. Los niveles de GSH se recuperaron 20 días después de la irradiación (acercándose al 100% del control), mientras que la actividad de GSHr por mg de tejido disminuyó un 20%. Más aún, la disminución de la actividad total de GSHr en el CE de los animales irradiados fue de aproximadamente un 55%, lo cual se correlaciona con la disminución observada en el peso del órgano ($r^2 = 0.9$). La caída en la actividad de GSHr se mantuvo aún a los 30 y 90 días, mientras que a esas edades los niveles de GSH aumentaron un 150 y 900%, respectivamente. Estos resultados sugieren que la disminución de la actividad de la GSHr observada en los CE irradiados no sería responsable del aumento tardío en los niveles de GSH, sino que sería consecuencia de la disminución en el peso del órgano. Este trabajo se realizó gracias a los aportes de los subsidios de UBA (M083) y CONICET otorgados a LRG.

101. (7497) ACTIVACIÓN POR DOPAMINA, NORADRENALINA Y SEROTONINA DE DIFERENTES VARIANTES POLIMORFICAS DEL RECEPTOR DOPAMINERGICO D4 HUMANO. WEDEMEYER, C; GOUTMAN, J.D; AVALE, M.E; RUBINSTEIN, M(1); CALVO, D.J(1)

INGEBI-CONICET. (1)Depto. Fisiología Biología Molecular y Celular FCEyN-UBA.

El receptor de dopamina D4 (D4R) pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. En la población humana existen variantes polimórficas del gen del D4R en la región codificante para el tercer dominio intracitoplasmático que interactuaría con proteínas G. Este polimorfismo consiste en repeticiones de 2 a 10 veces de secuencias de 48 pb. La existencia de variantes alélicas para los D4R podría implicar diferencias funcionales entre distintos subtipos del receptor. Con el objeto de caracterizar las propiedades fisiológicas y farmacológicas de los subtipos de D4R humano más frecuentes, se co-expresaron individualmente las variantes de 2, 4 o 7 repeticiones del D4R humano, en ovocitos de *Xenopus laevis*, junto con canales de potasio regulados por proteína G (GIRK). Utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos se observó que dopamina (DA), noradrenalina (NA) y serotonina (5HT) activan corrientes de potasio mediadas por canales GIRK luego de

la estimulación directa de los D4R. La afinidades aparentes de D4.2 y D4.7 para dopamina fueron similares ($EC_{50} = 1.02 \pm 0.06$ y 1.07 ± 0.04 nM respectivamente), mientras que los D4.4 mostraron una afinidad aparente por este agonista 5 veces menor ($EC_{50} = 4.89 \pm 0.07$ nM). Las curvas dosis-respuesta para NA y 5HT mostraron un perfil de activación similar para las 3 variantes del receptor, y diferencias en la afinidad entre ambos agonistas ($EC_{50} \sim 54$ nM para NA y $EC_{50} \sim 1$ μ M para 5HT). A su vez, NA se comportó como agonista total, mientras que 5HT como agonista parcial. La acción de las 3 monoaminas se bloqueó por PNU101387 (1 μ M), antagonista específico D4R y por sulpiride (1 μ M), antagonista selectivo tipo-D2. Los resultados obtenidos revelaron dos aspectos de los D4R que poseen un interés particular. Por un lado que las distintas variantes alélicas pueden presentar diferencias funcionales. Por otra parte, la activación directa de los D4R por NA y 5HT podría tener implicancias fisiológicas muy relevantes.

102. (7537) ACTIVIDAD SEROTONINÉRGICA EN EL NÚCLEO DORSAL DEL RAJE DE RATAS HIPONUTRIDAS EN EDAD PERINATAL: EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN REPETIDA DE FLUOXETINA. SODERO, AO; ORSINGER, OA; RAMÍREZ, OA

Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Ratas adultas sometidas a un esquema nutricional hipoproteico en edad perinatal muestran una mayor actividad del locus coeruleus (LC), principal núcleo noradrenérgico en el SNC, anormalidad que es revertida por la administración repetida de desipramina o fluoxetina. Un incremento en la actividad noradrenérgica central, mediado por hiperactividad del LC, ha sido relacionado con la fisiopatología del desorden de pánico (DP), patología en la cual los inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina o serotonina, como desipramina o fluoxetina, respectivamente, muestran eficacia terapéutica. Dado que existe una modulación recíproca entre el LC y el Núcleo Dorsal del Rafe (NDR), el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad de las neuronas serotoninérgicas en el NDR de ratas adultas deprivadas en edad perinatal y sus respectivos controles. Con este propósito, se realizaron registros extracelulares unitarios para determinar el número de neuronas espontáneamente activas, su velocidad de disparo y la sensibilidad de los autorreceptores 5-HT_{1A} (R5-HT_{1A}), que modulan la actividad del NDR. Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo en el número de células activas en animales deprivados, en tanto que la velocidad de disparo y la sensibilidad de los R5-HT_{1A} fueron similares a las de animales controles. Dado que fluoxetina resulta efectiva en el tratamiento del DP y su mecanismo de acción implica cambios adaptativos en los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico, evaluamos los efectos producidos por la administración repetida de fluoxetina (5 mg/kg/día durante 5 días) sobre la actividad del NDR. Este tratamiento revirtió el incremento en el número de células activas observado en ratas deprivadas, sin afectar su velocidad de disparo, y disminuyó la sensibilidad de los R5-HT_{1A} en forma similar en ambos grupos de animales. Los resultados obtenidos destacan la relevancia de la hiponutrición en edad temprana para el funcionalismo del SNC en el sujeto adulto.

103. (7679) EVALUACIÓN DE LA MODULACIÓN GABAÉRGICA EN LA AMÍGDALA BASOLATERAL EN ANIMALES ABSTINENTES A DIAZEPAM. ISOARDI, NA; CARRER, HF (1); MOLINA, VA

Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. (1) Instituto de Investigación Médica M. y M. Ferreyra (INIMEC-CONICET), Córdoba

En trabajos previos demostramos que animales abstinentes a diazepam (DZ) muestran un incremento en la excitabilidad

neuronal en la amígdala basolateral (BLA); presentando respuestas con múltiples espigas poblacionales evocadas por estimulación de aferencias corticales. Esta respuesta se mimetizó en animales control por perfusión con picrotoxina (PTX), mientras que la perfusión con DZ normalizó la respuesta en los animales abstinentes. Es bien conocido que en la BLA las interneuronas GABAérgicas juegan un rol fundamental en el control de la excitación de las células piramidales de proyección, tanto por mecanismos de inhibición «feedforward» como a través de inhibición recurrente. Con el objetivo de aclarar los mecanismos neuronales inhibitorios que participan en dicho control luego de la abstinencia a DZ, ratas machos fueron inyectadas durante 21 días con DZ (2mg/kg; i.p.) o solución vehículo (grupo control) y 4 días después de la última inyección fueron sacrificados, obteniéndose rebanadas frontales oblicuas de 250 μ m de espesor. Utilizando la metodología de «patch-clamp» en modalidad de célula entera, se registró en las células piramidales de BLA potenciales inhibitorios (IPSP) evocados por estimulación de aferencias corticales contenidas en la cápsula externa; y además corrientes inhibitorias (IPSC) evocadas por un pulso depolarizante suficiente para disparar un potencial de acción. Comparados con los animales control, los animales abstinentes a DZ mostraron una reducción significativa tanto de los IPSP ($p < 0.05$) como de las IPSC ($p < 0.005$). Mediante la perfusión con PTX (50 μ M) las IPSC y los IPSP fueron suprimidos en aproximadamente un 90%. Por otra parte, tanto las IPSC como los IPSP sólo se observaron cuando el estímulo era suficiente para evocar un potencial de acción en la célula piramidal. Estos resultados indican una clara disminución en la inhibición GABAérgica recurrente en BLA de los animales abstinentes, lo que podría explicar la hiperexcitabilidad neuronal que se observa como resultado de la abstinencia a DZ.

104. (7689) ÓXIDO NÍTRICO SINTASA NEURONAL Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL. EFECTO IN VIVO E IN VITRO DEL DEPRENIL. CZERNICZYNIC, ANALÍA; BUSTAMANTE, JUANITA; LORES ARNAIZ, SILVIA

Laboratorio de Radicales Libres en Biología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

El deprenil es un antidepresivo que actúa por inhibición de la monoaminoxidasa B (MAO B) y se postula que es capaz de generar cambios en la producción de óxido nítrico (NO) y en la función mitocondrial. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos in vivo e in vitro del deprenil sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en diferentes fracciones subcelulares de cerebro y su relación con la función mitocondrial. Asimismo, se evaluó la actividad de la MAO. Para el estudio in vivo, se administró deprenil (20 mg/kg) a ratones Swiss de 13 meses de edad y se sacrificaron 1.5 horas después de la inyección. Para los ensayos in vitro se incubaron mitocondrias, sinaptosomas y citosol de cerebro con distintas concentraciones de deprenil. Se determinó: a) actividad de MAO en membranas submitocondriales (SMP), b) actividad de NOS en distintas fracciones subcelulares, c) consumo de O₂ en mitocondrias intactas y d) velocidad de producción mitocondrial de H₂O₂. El tratamiento con deprenil provocó una inhibición de 45% en la actividad de la NOS en SMP de cerebro. El consumo de O₂ por mitocondrias de cerebro de ratones tratados se encontró aumentado en un 51% en el estado 3. En tanto, la inhibición de la MAO (55%) produjo una disminución en la velocidad de generación de H₂O₂ (46%) en mitocondrias de cerebro de ratones tratados. El deprenil es capaz de inhibir in vitro a la MAO y se observó que a concentraciones mayores de 5 μ M no ocurren cambios significativos en los niveles de inhibición. La incubación con deprenil en concentraciones suficientes para inhibir a la MAO, inhibe a la NOS en fracción mitocondrial, citosol y fracción sinaptosomal en forma dependiente de la concentración. De acuerdo a nuestros resultados, el deprenil es capaz de modificar la actividad de la NOS en las distintas fracciones subcelulares y de provocar alteraciones en la función mitocondrial. Estas propiedades junto con la inhibición de la MAO podrían contribuir a los efectos neuroprotectores de la droga en estudio.

105 (7715) EFECTO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES SOBRE EL ESTADO OXIDATIVO EN RATAS IRRADIADAS AL NACIMIENTO. DI TORO, CECILIA G.; ZIEHER, LUIS M.; GUELMAN, LAURA R.

1ª Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA.

El cerebelo de ratas Wistar es especialmente vulnerable a las radiaciones ionizantes aplicadas en el período neonatal, actuando las especies reactivas de oxígeno (ROS) como mediadoras del daño. Ciertos antioxidantes endógenos, tales como el Glutacion son capaces de neutralizarlas, de manera tal que podrían ser utilizados como indicadores de daño celular. El objetivo de este trabajo fue estudiar el perfil temporal del estado oxidativo del cerebelo irradiado, a través de la cuantificación del sistema Glutacion reducido (GSH)/Glutacion oxidado (GSSG) luego de diferentes tiempos post-irradiación (pi). Ratitas recién nacidas fueron expuestas a una dosis de 5 Gy de radiación g en la extremidad expélica y a distintos tiempos pi el cerebelo fue diseccionado y los niveles de GSH y GSSG fueron determinados. Los resultados mostraron una disminución inicial en los niveles de GSH con respecto al control, los cuales aumentaron significativamente ($p < 0.05$) a los 30 días pi (150% del control). Por el contrario, los valores de GSSG mostraron un aumento inicial con respecto al control ($p < 0.05$), el cual desapareció a los 30 días pi. El índice redox ($GSH + 2GSSG / 2GSSG \times 100$) resultó disminuido en etapas tempranas pi, mientras que a los 30 días sobrepasó los niveles control. Estos resultados sugieren que la exposición neonatal a radiaciones ionizantes generaría un estrés oxidativo inicial debido al aumento en los niveles de ROS, que posteriormente desencadenaría diferentes mecanismos compensatorios para intentar restaurar el estado oxidativo inicial.

106. (8038) EL EFECTO DE LA NEUROTENSINA SOBRE LA FIJACIÓN DEL LIGANDO (3)H-QNB A MEMBRANAS DEL SNC ES INDEPENDIENTE DEL RECEPTOR DE ALTA AFINIDAD DE LA NEUROTENSINA (NTS1). SCHNEIDER, P.; LÓPEZ ORDIERES, M.; OKITA KOKUBU, B.; MAGLIARELLA, P.; R DE LORES ARNAIZ, G

Instituto de Biología Celular y Neurociencias « Prof. E. De Robertis », Facultad de Medicina, UBA.

La neurotensina (NT) es un tridecapéptido ampliamente distribuido a nivel del SNC y periférico, que puede comportarse como un neurotransmisor o un neuromodulador de la transmisión dopaminérgica y colinérgica. Estudios previos demostraron que la NT, inhibe la actividad de Na^{+} , K^{+} -ATPasa de membranas sinaptosomales y disminuyó la fijación del ligando benzilato de quinuclidina tritioado (3)H-QNB, antagonista muscarínico, a membranas de corteza cerebral, hipocampo y cerebelo de rata; la acción de la NT sobre la enzima fue bloqueada con el SR 48692, antagonista específico de los receptores NTS1. El propósito de este estudio, fue evaluar la participación de los receptores de alta afinidad de NT (NTS1) en la inhibición que producía el péptido, sobre la fijación del (3)H-QNB. Con este objetivo, membranas de corteza cerebral, cerebelo e hipocampo se incubaron con SR 48692 10(-6)M en dimetilsulfóxido (DMSO) 10% v/v en presencia o ausencia de NT 10(-6)M. Las membranas se incubaron con DMSO y/o DMSO más NT 10(-6)M. Los resultados mostraron que la NT en presencia de DMSO produjo una inhibición de la fijación del (3)H-QNB a membranas de corteza cerebral, cerebelo e hipocampo del 49%, 32% y 53% respectivamente; esta inhibición no fue observada por la sola presencia de DMSO. Por otra parte, el SR 48692 produjo una inhibición del 50% en la fijación del ligando a membranas de corteza cerebral, lo que sugeriría un posible efecto directo sobre los receptores muscarínicos presentes en esa área. Finalmente, se preincubaron membranas en presencia de SR 48692 y luego se incubaron con NT, se produjo una inhibición significativa y de magnitud semejante a la producida por el péptido en ausencia de SR 48692, estos resultados estarían indicando que la inhibición de la fijación del ligando del receptor muscarínico por la NT sería independiente del receptor de la neurotensina de alta afinidad NTS1.

FARMACOLOGÍA 2: ESTUDIOS PRECLÍNICOS Y FARMACOCINÉTICOS

107. (6879) EFECTOS DEL ANANDAMIDE EN LA GLÁNDULA PARÓTIDA DE RATA MACHO CASTRADA. BUSCH, LUCILA; STERIN-BORDA, LEONOR; BORDA, ENRI

Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA.

La dependencia hormonal de las glándulas salivales es conocida. La castración de la rata macho provoca alteraciones en la respuesta de la glándula parótida tanto a estímulos adrenérgicos como colinérgicos, asociados o no a cambios en el número de receptores. En la glándula parótida el anandamide, a través del receptor CB[1], provoca aumento de AMPc lo que a su vez induce secreción de amilasa. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la respuesta secretora de la glándula parótida al anandamide se modificaba con la castración. Se castraron ratas macho de 90 días bajo anestesia con éter y a los 21 días se estudió el efecto del anandamide sobre el AMPc y la secreción de amilasa y se evaluó la expresión del receptor CB[1] ((3)H) SR141716A), utilizando métodos descriptos en la bibliografía. Los resultados de AMPc y amilasa se expresan en la tabla. Normales: N; castrados: C. El efecto de la castración fue revertido por la administración de testosterona (To) (0.4 mg/rata/día, 7 días). El Bmax (pmol/mg proteína) fue N: 968 ± 21 ; C: 515 ± 28 ($p < 0.001$) y C + To: 895 ± 25 y la Kd (nM) N: 0.56 ± 0.03 ; C: 0.61 ± 0.09 y C + To: 0.60 ± 0.04 . El SQ 22536 inhibió la secreción de amilasa y se observó una correlación positiva entre ese efecto y el AMPc (r: 0.9776).

Parámetro	AMPc (pmol/mg tejido) N	AMPc (pmol/mg tejido) C	Amilasa (% del total) N	Amilasa (% del total) C
Basales	0.41 ± 0.04	0.34 ± 0.04	4.5 ± 0.4	4.3 ± 0.4
Efecto máximo	1.12 ± 0.09	0.69 ± 0.07	8.9 ± 0.9	6.1 ± 0.6
CE[50]	2.8×10^{-8}	2.0×10^{-8}	8.6×10^{-9}	1.4×10^{-8}
pA[2] de AM281	7.4 ± 0.26	7.3 ± 0.30	7.7 ± 0.14	7.7 ± 0.23

La castración provoca una disminución del efecto del anandamide debido a una disminución del número de sitios. La afinidad de las drogas se mantiene a juzgar por la Kd, la CE[50] y el pA[2], lo mismo que su mecanismo de acción demostrado por el efecto del SQ y la correlación entre el AMPc y la secreción de amilasa.

108. (6975) PRODUCCIÓN DE L-CITRULINA EN ARTROPATÍA INDUCIDA TRATADA CON LASER Y ROFECOXIB. CAMPANA, VILMA; SIMES, JUAN CARLOS; MOYA, MÓNICA; REINOSO, CLAUDIA; PALMA, JOSÉ ATILIO

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

En las enfermedades inflamatorias los macrófagos activados secretan óxido nítrico coproducido con la L-citrulina. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el comportamiento de L-citrulina como marcador de un proceso inflamatorio inducido por cristales de hidroxapatita en articulaciones de ratas y posteriormente tratadas con láser de baja potencia o rofecoxib. Se inyectaron 2 mg de hidroxapatita en cada articulación de los miembros posteriores, en 3 veces con un intervalo de 24 hs. entre cada inyección. Se utilizó un láser de Helio-Neón de 7 mW. Las aplicaciones se realizaron diariamente sobre las articulaciones a las 24, 48 y 72 hs. al igual que los 0.05mg/día/rata de rofecoxib. La determinación de L-citrulina se realizó por espectrofotometría. Se utilizó el test de Fisher para comparaciones múltiples, considerando diferencia significativa $p < 0.05$. Entre los niveles de L-citrulina del grupo de ratas con artritis inducida (6.52 ± 0.44 mM) y los grupos control (ratas intactas) (3.58 ± 0.22 mM) y el grupo con artritis y con láser (5.26 ± 0.34 mM) existe una diferencia ($p < 0.01$). No existiendo diferencia entre este último grupo y el tratado con rofecoxib después de la inyección con cristales (5.38

± 0.28 mM) ni tampoco de éste con respecto al primero (artritis sin tratamiento). Los resultados demuestran que la terapia con láser actuaría inhibiendo los niveles de L-citrulina en los animales con artropatías inducidas con cristales de hidroxiapatita, no así en los animales tratados con rofecoxib. Los resultados obtenidos se correlacionan con las determinaciones de fibrinógeno plasmático, proteína C reactiva y estudios anatomopatológicos de los mismos grupos en los cuales se observó que el tratamiento de laserterapia posterior a la artropatía inducida genera una notable regresión del proceso inflamatorio. El láser de He-Ne sería efectivo en el tratamiento de las enfermedades por cristales actuando localmente y sin el inconveniente de los efectos adversos que provocan los AINES.

109. (7009) MODULATION OF EXTRACELLULAR MATRIX METABOLISM IN HUMAN ARTICULAR CHONDROCYTES BY THE NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG. BRIZUELA, NILDA Y.; DEMURTAS, SILVIA; MONTRULL, HILDA L.; SPITALE, LUIS; MEIROVICH, CARLOS

Cátedra Farmacología General. Fac. Cs. Médicas. U.N.Córdoba

Osteoarthritis (OA) is characterized by a degeneration of articular cartilage, in which the breakdown leads to matrix fibrillation and full-thickness loss of the joint surface. This is accompanied by hypertrophic bone changes with osteophyte formation. As an irreversible step in OA occurs when collagen is degraded, it was thought that the major enzyme accounting for collagen type II degradation was collagenase-1 or MMP-1. Nitric oxide (NO) is a free radical generated enzymatically from L-arginine by NO-synthase (NOS). NO contributes to inflammatory and arthritic tissue destruction by inhibition of collagen synthesis and by enhancing matrix metalloprotease. OA treatment is based currently on NSAIDs. The aim of this study was to investigate the effects in vitro of NSAIDs sodium diclofenac (DICLO), celecoxib (CELE) on the production of collagenase-1 (MMP-1) and levels of NO-[2] /NO-[3], stable metabolites of NO, by human articular chondrocytes of patients with OA. Methods: Chondrocytes were cultured, for 7 days, in the absence or presence of 1-10 $\mu\text{g/ml}$ of celecoxib or diclofenac. The age of patients ranged from 45 to 79 years. NO-[2]/NO-[3] concentrations were determined using the Griess assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to quantify MMP-1. Results: MMP-1 in the absence of NSAIDs was 1967 ± 665 ng/ml, in presence of DICLO was 1140 ± 155 ng/ml. MMP-1 in presence of CELE was 760 ± 75 ng/ml. NO in absence of NSAIDs was 47.3 μM . Diclofenac and celecoxib had no significant effect on NO production. Our studies clearly demonstrate that differences between individual NSAIDs with respect to their ability to modulate the proteases during OA. However diclofenac and celecoxib had no significant effect on NO production. These drugs do not slow down the progression of OA. Recent findings have shown a beneficial effect of inhibiting NO production, suggesting a complementary approach with drugs that inhibit NOS may be useful.

110. (7412) EVALUACIÓN DEL EFECTO DE COMPLEJOS DE VANADIO SOBRE LA ADHESIÓN Y EL SPREADING DE OSTEÓBLASTOS EN CULTIVO. CATTÁNEO, ELIZABETH; MOLINUEVO, M SILVINA; CORTIZO, ANA M; ETCHEVERRY, SUSANA B

Bioquímica Patológica, Fac Cs Exactas, UNLP. 47 y 115 (1900) La Plata. ecattaneo@biol.unlp.edu.ar

Se ha postulado que en mamíferos, el vanadio, es esencial para el normal desarrollo óseo. Desde hace unos años, nuestro grupo se dedica al estudio de complejos de vanadio(IV) con ligandos de interés biológico. Demostramos que GluVO, TreVO y VOAspi (complejos con glucosa, trehalosa y aspirina respectivamente) regulan la proliferación y diferenciación celular en un modelo de osteoblastos en cultivo. Sus mecanismos de acción involucrarían la fosforilación de proteínas y la producción de radicales libres. En células de mamífero dependientes de anclaje,

la adhesión al sustrato y el spreading celular son dos etapas que preceden a la proliferación. En este trabajo, estudiamos el efecto de diferentes dosis (10-500 mM) de TreVO, GluVO y VOAspi. Se evaluó la adhesión (coloración con Giemsa y recuento del número de células en 20 campos/disco) y el spreading (número de células con más de dos extensiones citoplasmáticas en 20 campos/disco). El ensayo se realizó sobre platos de plástico durante 2 hs. En las células UMR106, derivadas de un osteosarcoma de rata, se observó que los tres complejos inhiben la adhesión (20-80% basal, $p < 0.01$) y el spreading celular (0-60% basal, $p < 0.01$). Estos efectos dependieron de la dosis de cada complejo. Por otro lado, en los osteoblastos murinos normales, MC3T3E1, se observó que GluVO y VOAspi estimulan la adhesión celular (120-140% basal, $p < 0.05$) pero inhiben el spreading (10-90% basal, $p < 0.001$); mientras que TreVO no altera ninguno de estos parámetros en esta línea celular. En conclusión, estos compuestos son capaces de modular la adhesión y el spreading de células osteoblásticas. En células UMR106 producen una inhibición marcada de ambos fenómenos, mientras que en células MC3T3E1 estimulan la adhesión celular; resultados que correlacionan con los efectos proliferativos previamente reportados.

111. (7500) FARMACOCINÉTICA COMPARATIVA ENTRE UN PARCHO DE FENTANILO DE TIPO MATRIZ Y UNO DE RESERVORIO. USO DE NALTREXONA COMO ANTAGONISTA. DEL CERRO, EDUARDO LUIS; REY, RODOLFO (2); MIGUEL, FORTUNY; GABACH, ROBERTO

Amarin Technologies S.A. (2) Hospital Universitario Austral (Unidad de Investigación Clínica)

Se realizó un estudio piloto de biodisponibilidad comparando dos tamaños de un nuevo sistema transdermal de Fentanilo de tipo matriz y Durogesic 25 (parche de tipo reservorio) en 9 voluntarios sanos. El diseño fue abierto, de dosis simple, aleatorizado y triple cruzado. El estudio siguió los lineamientos de buena práctica clínica y pautas éticas internacionales. Cada parche fue aplicado en el brazo durante 3 días. Se administró naltrexona por vía oral en una toma diaria durante el uso de cada parche. Se obtuvieron en total 15 muestras de sangre durante cada período de tratamiento. La cuantificación de fentanilo en plasma se realizó por LC/MS/MS con un método validado. Resultados: Se encontró una correlación dosis-tamaño para el parche de fentanilo de tipo matriz. No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros PK del parche de matriz (14.5 cm²) y Durogesic 25. Los parches mostraron buena adhesión y similar incidencia de reacciones locales.

Parámetro	Fentanilo Matriz 10.6 cm ²	Fentanilo matriz 14.5 cm ²	Durogesic 25 (reservorio)
Cavg (pg/ml)	243 \pm 79	334 \pm 110	359 \pm 127
AUC (pgxh/ml)* (1.291)	22453 (1.216)	30182 (1.163)	30874
Cmax (pg/ml)	347 \pm 106	447 \pm 195	537 \pm 215
Tmax (h)	36.9 \pm 17.0	34.7 \pm 12.7	38.9 \pm 18.0
Índice de Fluctuación	0.59 \pm 0.22	0.41 \pm 0.30	0.72 \pm 0.33

Datos (promedio \pm STD): *: media geométrica (factor para LC 90%)

El nuevo parche de fentanilo de tipo matriz (14.5 cm²) logró concentraciones plasmáticas y un perfil farmacocinético similar a Durogesic 25. Se encontró proporcionalidad entre el tamaño del parche de matriz y la dosis entregada. El empleo de naltrexona fue considerado útil para prevenir la toxicidad potencial del fentanilo.

112. (7784) FARMACOCINÉTICA PLASMÁTICA DE BALOFLOXACINA EN CABRAS. GARCÍA OVANDO, HUGO; LUDERS POST, CARLOS; PRIETO, GUILLERMO; ERRECALDE, CARLOS; VALEK, JAQUELINA; MAGNOLI, ALEJANDRA

Farmacología, Depto. Clínica Animal, Fac. Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto

Balofloxacin es un antibacteriano de la familia de las fluoroquinolonas. Este trabajo consistió en determinar parámetros farmacocinéticos de su absorción y disposición en caprinos ($n=7$), para lo cual se administró una solución inyectable al 2.5%, en dosis única de 5 mg/Kg, en bolus intravenoso y en inyección subcutánea, utilizando un diseño cruzado de tratamiento. Previamente y posterior a su administración, se tomaron muestras de sangre en tiempos prefijados. El ensayo preparativo consistió en la extracción líquido-líquido del analito en estudio, con diclorometano. Para la separación del analito se utilizó cromatografía de alta eficiencia (HPLC), efectuando una elución isocrática en fase reversa, con fase móvil, compuesta por H₂O: ACN:TEA (80:19:1 v/v). Volumen de inyección 100 μ L, flujo 1.3 ml/min, y lectura en fluorómetro a 278 nm de excitación y 500 nm de emisión. Los datos de concentración en función del tiempo, se analizaron por el modelo cinético no compartimental. Los parámetros obtenidos para la vía intravenosa fueron: $t_{1/2}=2,8 \pm 0,9$ h; tiempo medio de residencia (TMR)= $3,2 \pm 0,8$ h; $Cl_{tot}=7,43 \pm 2,6$ mL/min/Kg; $V_{dss}=1,5 \pm 0,5$ L/Kg; $ABC_{ss}=748,7 \pm 263$ μ g/min/mL. Excepto para ABC_{ss} , los valores no difieren significativamente de los obtenidos del ensayo por vía subcutánea ($P < 0,05$). En el cual se obtuvo un $C_{m\acute{a}x}=1,56 \pm 0,6$ μ g/mL, con un $t_{m\acute{a}x}=42,5 \pm 38,2$ min, y un 75% de biodisponibilidad. El método cromatográfico utilizado es sensible y específico para determinación de balofloxacin. La extracción del analito con diclorometano, es más económica que la extracción en fase sólida. El perfil farmacocinético de la balofloxacin obtenido en cabras, se caracteriza por una buena absorción subcutánea, cuya biodisponibilidad correspondió al 75%. El valor de volumen de distribución promedio, superior a 1 L/kg indica una buena capacidad para difundir a los territorios extravasculares y tejidos, característica importante para el tratamiento de infecciones bacterianas de distinta localización.

113. (8023) BIODISPONIBILIDAD DE UNA SUSPENSIÓN ORAL DE INDINAVIR DESARROLLADA PARA USO PEDIÁTRICO. CURRAS, VERÓNICA; BRAMUGLIA, G; NISELMAN, V; CÁCERES GUIDO, P; ZYLBERSZTAJN, B; BUONTEMPO, F; MATO, G; BOLOGNA, R; RUBIO, MC

Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Area Farmacia, Infectología, Hospital de Pediatría Garrahan

Introducción: las razones por las cuales se puede producir fracaso en la terapia antirretroviral con los inhibidores de proteasa incluyen: desarrollo de resistencias asociada a incumplimiento o a concentraciones plasmáticas infraterapéuticas, o de índole farmacocinético, debido a que se metabolizan y actúan como sustratos del citocromo P450, y de la glicoproteína P, entre otros factores que pueden alterar la absorción y la biodisponibilidad. Esto se traduce en una gran variabilidad tanto intra como interindividual en las concentraciones plasmáticas alcanzadas por estos fármacos. Objetivos: desarrollar una formulación magistral líquida que pueda ser utilizada en forma alternativa en la población pediátrica a partir de las cápsulas de 400 mg de indinavir. Con dicha formulación se realizó un estudio de estabilidad y un estudio de biodisponibilidad en voluntarios sanos adultos. Materiales y métodos: las concentraciones de indinavir fueron determinadas mediante HPLC. La fase móvil utilizada estaba compuesta por buffer fosfato monopotásico 5 mM y acetonitrilo (60:40). El coeficiente de variación intra e inter-día fue menor al 7%. Resultados: la formulación líquida de indinavir desarrollada a partir de la apertura de las cápsulas resultó estable luego de 28 días almacenada en heladera (4°C). El estudio de biodisponibilidad ($n = 5$) mostró que la suspensión de indinavir alcanzó un valor de $C_{m\acute{a}x}$ promedio de 1480.1 (SD: 0.99) ng/ml, el $T_{m\acute{a}x}$ fue de 0.6 (SD: 0.25) hs. El análisis no compartimental mostró un valor de $t_{1/2}$ promedio de 1.2 h (SD: 1.2) y un AUC promedio de 3.5 mg.L/h. Los resultados sugieren que la administración de una formulación líquida de indinavir podría ser una

alternativa eficaz para el tratamiento de la infección por HIV en la población pediátrica.

114. (8032) FARMACOCINÉTICA DE TOPOTECAN ADMINISTRADO POR VÍA PERIOCLAR EN CONEJOS. BRAMUGLIA, GUILLERMO; CHANTADA, GL; CACICI, JG; FANDIÑO, A; DE DÁVILA, MTG; CROXATTO, O; MATO, G; SCOPINARO, M; RUBIO, MC; DUNKEL, IJ; ABRAMSON, DH

Cátedra Farmacología, FFyB, UBA; ININFA (CONICET); Hosp Garrahan Sloan Kettering Cancer Center USA

Introducción: la quimiorreducción es el tratamiento estándar para el retinoblastoma intraocular en niños. Los quimioterápicos se administran habitualmente por vía intravenosa (IV) con el objetivo de reducir el volumen tumoral, y así facilitar el tratamiento local. La administración perioclar (PO) permite obtener mayores concentraciones de droga en el humor vítreo, pero pocos agentes han sido estudiados en el retinoblastoma. Objetivos: el objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de topotecan (TP) en humor vítreo luego de la administración PO en conejos. Metodología: Se utilizaron once conejos albinos. A nueve de ellos se les administró 1 mg de TP por vía PO en cada ojo, y se obtuvieron niveles en humor vítreo hasta 24 horas luego de la administración. A los restantes dos animales se les administró TP 0.5 mg/kg y se obtuvieron niveles en humor vítreo a las 2 hs. Los niveles de TP total y de la forma lactona fueron determinados mediante HPLC. Todos los animales fueron enucleados al terminar los experimentos y los ojos fueron evaluados respecto a la toxicidad. Resultados: TP total y lactona produjeron un pico 30 min después de la administración PO (media 158 ng/ml y 122 ng/ml respectivamente). Los $t_{1/2}$ estimados fueron 2.4 hs y 2.8 hs respectivamente. El AUC calculada para la droga total y la lactona fueron 263.38 ng/ml.hr y 105 ng/ml.hr respectivamente. No se observó evidencia de toxicidad mediante el análisis histopatológico. Los altos niveles de TP alcanzados luego de la administración PO sugieren que futuros estudios deberían ser realizados para demostrar la utilidad de esta aplicación en humanos

INMUNOLOGÍA 1: INMUNIDAD CONTRA MICOBACTERIAS

115. (7276) EFECTO DE SOBRENADANTES DE CÉLULAS PERIFÉRICAS MONONUCLEARES (CPM) DE ENFERMOS DE TUBERCULOSIS (TB), REESTIMULADAS IN VITRO, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) EN CÉLULAS ADRENALES. MAHUAD, CAROLINA; BOZZA, VERÓNICA; BAY, MARÍA LUISA; GIRI, ADRIANA (2); BESEDOVSKY, HUGO (3); DEL REY, ADRIANA (3); BOTTASSO, OSCAR

Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas-UNR, Rosario, Argentina Fac.Cs Bioq y Farm-UNR, Rosario (2); Inst. Fisiol. Normal y Patológica, Marburg Alemania (3)

Previamente observamos un aumento y descenso en los respectivos niveles plasmáticos de cortisol y DHEA en pacientes con TB. Dado que la respuesta inmune (RI) puede afectar la producción de estos esteroides, se analizó si los sobrenadantes de cultivo de CPM reestimuladas con M. tuberculosis sonicado (ST), de pacientes TB, modificaban la secreción de cortisol y DHEA en una línea de células adrenales (H295-R). Se cultivaron CPM de 13 sujetos respondedores al ST (Normales) y 27 casos de TB (9 leves -Le-, 11 moderados -Mo- y 7 severos -Se-) durante 36 h, expuestas a ST (sobrenadante de ST -SST-) o no (sobrenadante control -SC-). Las células adrenales (CA) se cultivaron 5 días y luego se enfrentaron 48 h a SST o SC con y sin Forskolin -F- (control de estimulación positivo) para la posterior medición de cortisol y DHEA (EIA DRG systems) en los sobrenadantes. La sensibilidad del método no permitió detectar cortisol. Las CA tratadas con SC o SST presentaron niveles menores de DHEA ($p < 0.02$,

vs. sus respectivos cultivos controles, esto es sin SC o SST). Al calcular la producción de DHEA respecto del correspondiente cultivo control, las CA tratadas con sobrenadantes de pacientes mostraron porcentajes inferiores a las adicionadas con sobrenadantes de Normales. Para el tratamiento SST+F, y asignando 100% a la producción de DHEA con SST de Normales, el descenso relativo en los cultivos con SST de pacientes fue (media±es %): Le=70.5±5.3; Mo=83.8±1.6; Se=63.8±0.5 ($p<0.002$, $p<0.02$ y $p<0.001$ respecto de Normales; Mo vs. Se y Le $p<0.05$). El ST por sí solo no afectó la secreción de DHEA. Los productos de la RI específica al M. tuberculosis, sobre todo de pacientes TB, reducen la producción de DHEA en esta línea celular.

- 116. (7332) EFECTO DEL M. VACCAE (3 DOSIS) SOBRE LA CAPACIDAD OXIDATIVA (E.R) Y NIVELES DE TNFA EN SOBRENADANTE DE CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (MN) Y POLIMORFONUCLEARES (PMN) EN PACIENTES TUBERCULOSOS (TB).** DLUGOVITZKY, DIANA GRACIELA; FIORENZA, G; FARRONI, M (1); BOGUÉ, C (1); NEUMAN, M (1); STANFORD, J (2)

Sección Inmunología - Cátedra de Microbiología - Facultad de Ciencias Médicas - UNR. (1) Hosp. Carrasco, (2) Esc. Med. Univ. Londres

Anteriormente demostramos el efecto inmunomodulador del M. vaccae (M. v) (1 dosis) en parámetros clínicos e inmunológicos en pacientes TB. En este estudio se evaluó el Estallido Respiratorio (E.R) de MN y PMN estimulados o no con M. tuberculosis H37Rv inactivado en pacientes TB tratados con M.vaccae y su relación con los niveles de TNFa en sobrenadante de cultivo(s.c). Se estudiaron 22 pacientes TB (HIV-) de ambos s (38±13.5 años). Se efectuó el diagnóstico clínico, radiológico y bacteriológico y estudios inmunológicos en sangre. 12 pacientes TB recibieron terapia convencional (DOTS) y una dosis mensual de M.vaccae, i.d., 0.1 ml de suspensión de bacilos muertos por calor (NCTC 11659), 10mg bacilos/ml, (provistos por Dr. J. Stanford). 10 pacientes TB recibieron DOTS + Placebo (Control). En los 3 meses sucesivos se repitió el tratamiento y controles clínicos e inmunológicos en ambos grupos. De la sangre se separaron MN y PMN (gradiente de Ficoll-Triyoson) y se cultivaron en RPMI 1640 con y sin estímulo. E.R se obtuvo por Citometría de flujo y se expresó como R= IFME/IFMB (IFM: Intensidad de fluorescencia media). TNFa se evaluó en s.c (ELISA;R&D). TB tratados con M. vaccae: R: MN: M1 vs M3: $p<0.05$, M1 vs M4: $p<0.001$, M2 vs M4: $p<0.01$. PMN: M1 vs M3: $p<0.001$, M1 vs M4: $p<0.001$, M2 vs M4: $p<0.01$. TNF: MN: M1 vs M3: $p<0.01$, M1 vs M4: $p<0.001$, M2 vs M4: $p<0.01$. PMN: M1 vs M3: $p<0.05$, M1 vs M4: $p<0.001$, M2 vs M4: $p<0.05$. La capacidad oxidativa de CMN y PMN (E.R) es estimulada por el tratamiento de los pacientes TB con 3 dosis de M. vaccae, a partir de la segunda dosis y es significativamente mayor que la del grupo Control. Los datos de TNFa en s.c. se correlacionan con los de E.R. El efecto inmunomodulador de M. vaccae se expresa también sobre la funcionalidad de células involucradas en la respuesta inmune frente al M. tuberculosis y ante un estímulo específico.

- 117. (7420) LA IL-9 INHIBE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL MYCOBACTERIUM LEPRAE EN CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA.** PONCINI, CAROLINA; FINIASZ, MARTA; FRANCO, MARIA CLARA; RIVERO, ALEJANDRA; FINK, SUSANA

Inmunología, IHema, Academia Nacional de Medicina

La IL-9 es una citoquina pleiotrópica tipo 2 capaz de prevenir la apoptosis de linfocitos T (LT) inducida por dexametasona. La inducción de apoptosis es una estrategia empleada por las micobacterias para evadir los mecanismos de defensa del huésped, contribuyendo a la persistencia bacteriana. Anteriormente demostramos que la IL-9 inhibía la apoptosis en LT cultivados en presencia de M.tuberculosis (Mtb). Para averiguar si el efec-

to observado era una característica propia del Mtb o si ocurría lo mismo con otras micobacterias, células mononucleares de sangre periférica obtenidas de donadores normales fueron cultivadas con M.leprae (Mlep) en presencia o ausencia de IL-9 por períodos de hasta 7 días. Se estudió la viabilidad por microscopía de fluorescencia con naranja de acridina y bromuro de etidio a los 2 y 7 días de cultivo y se analizaron los núcleos por citometría de flujo mediante la coloración con iodo de propidio. Tratamientos: Control (C), IL-9 (C9), Mlep (MI), MI+IL-9 (MI+9). Resultados (% apoptosis, media±ES): 2 días (n=6), C: 14+6, C9: 10+4, MI: 16+6, MI+9: 9+3; 7 días (n=11), C: 29+3, C9: 22+2, MI: 39+5, MI+9: 25+2. Se observó un comportamiento similar al estudiar la apoptosis en los núcleos por citometría de flujo. La IL-9 inhibe la apoptosis inducida por Mlep en las células mononucleares. Este efecto de la IL-9 permitiría preservar la respuesta de defensa celular contra el Mlep. Resultados preliminares sugieren que el mecanismo no parece involucrar a la molécula antiapoptótica de la vía intrínseca BclXL.

- 118. (7471) NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTISOL Y DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE CITOCINAS POR CÉLULAS PERIFÉRICAS MONONUCLEARES DE PACIENTES TUBERCULOSOS.** BOZZA, VERÓNICA; MAHUAD, CAROLINA; MAHUAD, DANIEL; D'ATTILIO, LUCIANO; DÍDOLI, GRISELDA; BAY, MARÍA L.; BESEDOVSKY, HUGO (2); DEL REY, ADRIANA (2); BOTTASSO, OSCAR

Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas-UNR, Rosario Argentina (2) Inst. Fisiol. Normal y Patológica, Marburg, Alemania

Estudios previos en CPM de pacientes con Tuberculosis (TB) estimuladas in vitro con M. tuberculosis sonicado (ST) mostraron una menor producción de interferón gamma (IFN-g) con un incremento en la síntesis de factor transformante de crecimiento beta (TGF-b) sin mayores cambios en la secreción de interleuquina 10 (IL-10). Las mediciones en plasma indicaron un aumento y descenso en los respectivos niveles de cortisol y DHEA resultante en un incremento del índice cortisol/DHEA. Dado la acción inmunomoduladora de estos esteroides investigamos si existía una relación entre las concentraciones de cortisol y DHEA con la síntesis de IFN-g, IL-10 y TGF-b. Las CPM de controles respondedores (Co) y pacientes con TB pulmonar se cultivaron por 36 hs. o 4 días en presencia de ST (10µg/ml) y se determinaron los niveles de IFN-g, IL-10 y TGF-b (EIA, Pharmingen) en los sobrenadantes (SN). También se cuantificaron los niveles plasmáticos de cortisol y DHEA (EAI, DRG systems). Dentro de los Co (con valores normales de cortisol y DHEA), los niveles de DHEA mostraron correlaciones positivas o negativas con los valores de IFN-g ($r: 0.83$, $n=7$, $p<0.05$) o IL-10 ($r: -0.63$, $n=13$, $p<0.05$) en SN de 4 días; mientras que la relación cortisol/DHEA estuvo positivamente asociada con IL-10 tanto en SN de 36 h ($r: 0.83$, $n=12$, $p<0.01$) como de 4 días ($r: 0.69$, $n=13$, $p<0.01$). En los pacientes la relación cortisol /DHEA (incrementada respecto de los Co) se correlacionó con los valores de TGF-b ($r: 0.43$, $n=22$, $p<0.05$) e IL-10 ($r: 0.39$, $n=30$, $p<0.05$) en SN de 36 h. Los niveles circulantes de DHEA y el balance entre ésta y cortisol son capaces de influenciar la actividad ex vivo de las CPM. El aumento en la relación cortisol/DHEA de los enfermos TB operaría como un factor contributorio para la síntesis de un patrón de citocinas desfavorable para este tipo de afección.

- 119. (7558) EXPRESIÓN DE CD11B EN CÉLULAS MONONUCLEARES (MN) Y POLIMORFONUCLEARES (PMN) EN PACIENTES TUBERCULOSOS (TB) TRATADOS CON M.VACCAE (3 DOSIS) Y SU RELACIÓN CON NIVELES SÉRICOS DE TNFA E IL4.** DLUGOVITZKY, DIANA GRACIELA; FIORENZA, GLADYS; FARRONI, M (1); AITA, J (1); MILICICH, G (1); STANFORD, J (2)

Sección Inmunología - Cátedra de Microbiología - Facultad de Ciencias Médicas - UNR. (1) Hosp. Carrasco, (2) Esc. Med. Univ. Londres

Anteriormente se ha demostrado que la inmunoterapia con *M. vaccae* (M.v) (1dosis) modifica parámetros clínicos y e inmunológicos del paciente TB tales como niveles séricos de algunas citocinas y anti-hsp de 65 y 70 kDa. En este trabajo se estudió el efecto del tratamiento con *M. vaccae* en triple dosis sobre la expresión de CD11b, como indicador de activación, de MN y PMN, en pacientes TB. Se estudiaron 21 pacientes TB (HIV-) de ambos s (38±13.5 años, DS). Tras el diagnóstico clínico, radiológico y bacteriológico se tomó una muestra de sangre i.v, para estudios inmunológicos. 12 pacientes TB recibieron la terapia convencional (DOTS) y un inóculo mensual de *M. vaccae* (0.1 ml suspensión de bacilos muertos por calor, cepa NCTC 11659, en buffer de boratos salino, 10 mg de bacilos/ml, i.d; suministrado por Dr. John Stanford, Univ. de Londres). 10 pacientes TB que recibieron DOTS más Placebo (PI) (Control). En los 3 meses siguientes se efectuó la misma terapia, y controles clínicos e inmunológicos. MN y PMN se separaron por gradiente Ficoll-Hypaque y se cultivaron en RPMI 1640. CD11b se midió por Citometría de Flujo y se expresó como Intensidad de Fluorescencia media. CD11b: M.v: MN: M1 vs M3: p<0.01, M1 vs M4: p<0.001, M2 vs M4: p<0.01. PMN: M1 vs M3: p<0.01, M1 vs M4: p<0.001, M2 vs M4: p<0.01. PI: MN: M1 vs M4: p<0.001, M2 vs M4: p<0.01. TNFa: M.v: Suero: M1 vs M3: p<0.05, M1 vs M4: p<0.001, M2 vs M4: p<0.01. IL4: M.v: Suero: M1 vs M3: p<0.001, M1 vs M4: p<0.001, M2 vs M4: p<0.01. PI: M1 vs M4: p<0.001, M2 vs M4: p<0.01. El efecto inmunomodulador del *M. vaccae* en pacientes TB se evidenció como un aumento significativo de la expresión de CD11b en CMN y PMN, a partir de la segunda dosis y también frente a los datos del grupo con Placebo. Además, el efecto se manifestó en la modificación de los niveles de citocinas, como TNFa e IL4 que se correlacionaron negativamente con CD11b.

120. (7608) EFECTO DE LOS NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS (PMNAPO) SOBRE LA MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS (iDC) EN TUBERCULOSIS (TB). ALEMÁN, MERCEDES; SAAB, MARÍA (2); DE LA BARRERA, SILVIA (1); SCHIERLOH, PABLO (1); BALDINI, MATÍAS (2); YOKOBORI, NOEMÍ (1); SASIAIN, MARÍA (1)

IIHema, Academia Nacional de Medicina. División Neumología, Hospital Muñiz

Las iDC están presentes en el pulmón donde fagocitan al *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), maduran por efecto de diferentes estímulos y migran a ganglios iniciando así la respuesta inmune. Dado que las iDC fagocitan también PMNApo que arribaron en una primera fase al pulmón, quisimos estudiar el efecto que tiene la sobre la capacidad madurativa del Mtb en iDC. iDC fueron generadas en cultivo a partir de monocitos aislados de pacientes con tuberculosis pulmonar (TB) e individuos sanos (N) con IL-4 y GM-CSF durante 7 días. Luego se incubaron 1h con PMN apoptóticos (18 hs en cultivo) o con sobrenadantes de esos cultivos (SN). Se estimuló o no la maduración de las iDC con Mtb en relación 5:1 durante 24 horas determinándose luego la expresión de CD1a, CD14, CD86, CD83, HLA-DR y fagocitosis. Resultados: La expresión de CD1a aumenta durante el cultivo en N y TB (p<0.05;p<0.0005). Contrario a los N, las TB iDC tienen una mayor expresión de CD86 (p<0.05) y conservan una población CD14+ durante la maduración (p<0.03). Estimulando 24 hr con Mtb las iDC reducen su capacidad fagocítica y se induce el aumento de marcadores de maduración (CD83 p<0.02; DR p<0.01; CD86 p<0.03) que es inhibido en presencia de PMN apoptóticos (p<0.02). Esto no ocurre con los SN de PMN. En TB el aumento de CD86 como la producción de IFN γ inducido por Mtb se inhibe con el bloqueo de TLR2. Por otra parte si Mtb esta presente desde el inicio del proceso de diferenciación, se generan iDC CD1a low,CD14-,CD86 high. i) Mtb induce la maduración de las iDC conservando también CD14. En TB la expresión de CD86 como la de IFN γ inducido por Mtb estaría mediado por

TLR2 ii) La maduración de las iDC inducida por Mtb es inhibida por la fagocitosis de PMN apoptóticos y no por factores solubles secretados por estos iii) Mtb interfiere con la diferenciación de iDC inhibiendo el aumento de CD1a e incrementando la molécula co-estimuladora CD86.

121. (7623) TRANSFERENCIACIÓN DE POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS (PMN) EN EL SITIO DE INFECCIÓN EN TUBERCULOSIS (TB). ALEMÁN, MERCEDES; DE LA BARRERA, SILVIA(1); SAAB, MARÍA(2); SCHIERLOH, PABLO(1); BALDINI, MATÍAS(2); YOKOBORI, NOEMÍ(1); SASIAIN, MARÍA(1)

IIHema, Academia Nacional de Medicina. División Neumología, Hospital Muñiz

En ciertas infecciones bacterianas los PMN pueden adquirir características de células dendríticas (CD), jugando un rol más activo en la respuesta inmune adaptativa. Esto también se puede inducir in vitro con IFN γ , GM-CSF o TNFa. El objetivo de este trabajo fue determinar si PMN presentes en el sitio de infección del Mtb, donde estas citoquinas (CK) están presentes, subyacen a dicho proceso denominado transferencia. Para esto analizamos la expresión de CD83, CD86 y MHC II, en PMN de derrames pleurales (DP-PMN) de pacientes con TB con o sin compromiso pulmonar y se comparó con derrames pleurales de paraneumonías (PN). Como control usamos PMN de sangre periférica del mismo paciente (SP-PMN). Los DP se obtuvieron por toracocentesis, extrayéndose a la vez SP. Los PMN purificados se marcaron con anticuerpos específicos analizándose la intensidad media de fluorescencia (MIF) y/o % de células por citometría de flujo. Resultados: Observamos que 6/12 TB expresan CD86 en SP-PMN y en todos aumenta en el DP (p<0.03), mientras que no se expresa en SP- o DP-PMN de PN. La expresión de MHC-clase II está aumentada en DP-PMN de TB (p<0.008) comparado con SP-PMN, no observándose lo mismo en DP paraneumónicos. Más aún, la expresión de CD83 que es exclusiva de células CD, aparece en DP-PMN de los TB sin perder la expresión de los marcadores típicos de PMN. A su vez los DP-PMN de TB expresan altos niveles de TLR2 (p<0.03). Una elevada expresión de CD83, CD86 y MHC-clase II en DP-PMN sugiere que el patrón de CK presentes en DP puede inducir la síntesis de estas moléculas en el PMN adquiriendo características de CD. Esto, junto con una mayor expresión de receptor del Mtb, TLR2, permitiría conectar al PMN con la respuesta inmune adquirida en tuberculosis.

122. (7637) CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE MONOCITOS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTE. BEIGIER-BOMPADRE, MACARENA (1); SCHIERLOH, PABLO (1); BARRIONUEVO, PAULA (1); VULCANO, MARISA (1); YOKOBORI, NOEMÍ (1); GARCÍA, ANA (2); VESCOVO, MARISA (2); ISTURIZ, MARTÍN (1); SASIAIN, MARÍA C (1)

(1) IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires. (2) Hospital F.J. Muñiz

La tuberculosis es una enfermedad crónica causada por la bacteria Gram + *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). La tuberculosis multirresistente (MDR-TB), caracterizada por la resistencia a las drogas de primera línea rifampicina e isoniazida, es un grave problema de salud pública a nivel mundial porque no hay un único tratamiento para estos pacientes. En este trabajo se analizó la respuesta inflamatoria de monocitos y linfocitos T de pacientes MDR-TB en tratamiento con diferentes drogas (n=5), comparándose con pacientes con tuberculosis avanzada no MDR (TB) (n=5) y dadores normales (n=5). Por citometría de flujo se determinó la expresión del Toll-like Receptor 2 (TLR2), CD14, CD11b y CD86. El receptor TLR2, que una componentes de pared del Mtb, está aumentado en pacientes MDR-TB respecto de pacientes TB y dadores normales (MIF \pm SEM): MDR-TB= 200 \pm 16; TB= 120 \pm 30; Normal= 160 \pm 08 (p<0.05). No se observaron

diferencias en la expresión de CD14, CD11b ni CD86 entre pacientes TB-MDR, TB y dadores normales. El porcentaje de linfocitos T CD4+ MDR-TB que producen IFN-g en respuesta a Mtb es menor que el de los dadores normales: MDR-TB= 0,4%; Normal= 12%. Sin embargo, frente a la bacteria Gram + *Staphylococcus epidermidis* el 5% de los linfocitos T CD4+ MDR-TB producen IFN-g, igual que los dadores normales. El porcentaje de monocitos CD14+ MDR-TB que producen IL-10 en respuesta a Mtb es mayor que el de TB y dadores normales. Estos resultados, si bien preliminares, sugieren que los pacientes MDR-TB presentan alteraciones más pronunciadas en la producción de IFN-g e IL-10 que los TB. La alta expresión de TLR2 en monocitos circulantes sugeriría que al extravasar al sitio de infección reconocerían a antígenos de la pared del Mtb cuya exposición crónica puede inhibir funciones de las células presentadoras de antígeno.

123. (7643) CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS (CPA) EN TUBERCULOSIS (TB) EN EL SITIO DE INFECCIÓN. YOKOBORI, NOEMÍ(1); SCHIERLOH, PABLO(1); ALEMÁN, MERCEDES(1); BEIGIER-BOMPADRE, MACARENA(1); ALVES, LEANDRO(2); ROLDÁN, NICOLÁS(2); DE LA BARRERA, SILVIA(1); SASIÁN, MARÍA(1)

IIHema, Academia Nacional de Medicina. División de Neumonología Hospital Muñiz

La pleuresía tuberculosa puede deberse a una primo infección o complicación de una tuberculosis pulmonar. Las CPA residentes (macrófagos (MO) alveolares) y/o reclutadas (células dendríticas inmaduras y MO derivados de monocitos) al sitio de infección interaccionan por medio de receptores de la inmunidad innata y de moléculas MHC y coestimuladoras en su superficie con el *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) modulando la respuesta inmune. Dado que esto determinará el desarrollo de una respuesta inmune eficiente, se caracterizó fenotípicamente a las CPA in situ derivadas de derrames pleurales (LP) y sangre periférica (SP) de TB (n=10). Los LP se obtuvieron por toracocentesis, extrayéndose a la vez SP. Las CPA purificadas se marcaron con anticuerpos específicos analizándose la intensidad media de fluorescencia (MIF) y/o % de células por citometría de flujo. Los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) en las CPA de LP, mostraron un aumento en la expresión de TLR2 (MIF= 343.8±87.6 vs 116.0±27.4, p<0.05), disminución del % de CD14+ (p<0.05) manteniendo o aumentando su densidad dentro de esta población positiva y aumento del % DC-SIGN+ (40.3±4.5% vs 21.2±5.4%, p<0.05) comparado con SP del mismo paciente. Mientras que el % de CPA MHC I+ no varía, las MHC II+ aumentan en LP (92±3% vs 38±7%, p<0.05). La población que expresa la molécula inducible por stress MICA, también es mayor en LP (75.5±6.1 vs 33.2±6.5, p<0.05). A pesar de que el % de CPA CD86+ y CD40+ disminuyen en LP, una subpoblación mantiene elevados los niveles de expresión. Por otra parte, el % de CD83+ aumenta. Las características inflamatorias del sitio de infección propiciarían la maduración de las CPA y el aumento de receptores para PAMPs favoreciendo la generación de una óptima la respuesta innata, a la vez que las moléculas MHC II y MICA permitirían el cross-talk con NK y/o Tg/d.

124. (7691) LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE A MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS DE BOVINOS INFECTADOS INCREMENTAN LA ACTIVACIÓN DE NFKB DE MACRÓFAGOS BOVINOS. MUNDO, SILVIA L.; GARCIA, MARIANA (2); DURRIEU, MARÍA (1); GENTILINI, ELIDA (1); ALVAREZ, ELIDA (2); HAJOS, SILVIA (2)

Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA.

La paratuberculosis es una enteritis granulomatosa crónica que afecta a bovinos, producida por *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (Map). Map puede sobrevivir y replicar dentro

de macrófagos. La producción de anticuerpos (Ac) se incrementa sólo en los últimos estadios. Entre los componentes del Map, la proteína p34 es inmunodominante para linfocitos B bovinos. Para determinar si los Ac específicos frente a Map y p34 pueden modular el curso de la patogénesis de Map, estudiamos su efecto en la interacción entre la bacteria y macrófagos. Se obtuvieron Ac de bovinos naturalmente infectados (5), vacunados con Map inactivado (3), vacunados con la proteína p34 (3) y controles negativos sanos. Los Ac fueron aislados y purificados por afinidad utilizando columnas de Map y p34. Los Ac fueron titulados por ELISA y caracterizados sus isotipos. Los Map fueron oponentizados con los diferentes Ac y se infectaron cultivos de una línea de macrófagos bovinos (BoMac) durante 30 min. a 37°C. Se obtuvieron extractos nucleares y se evaluó activación de NFKB por retardo de movilidad electroforética. Los valores de endotoxinas en todos los Ac fueron similares (2-8 UE). La especificidad se analizó por competencia con sonda fría y las subunidades se identificaron con anticuerpos anti-p50 y p65. Las BoMac expresan un nivel de activación de NFKB basal. Los Ac provenientes de bovinos infectados incrementaron la activación de NFKB nuclear, mientras que los Ac provenientes de bovinos vacunados con Map o p34 no modificaron el nivel basal de activación de las BoMac. El incremento de activación de NFKB observado sólo en los Ac de bovinos infectados indicaría que existen diferencias en la funcionalidad de los Ac producidos por animales que responden a la infección bacteriana y de aquellos inducidos por bacteria inactivada o una proteína bacteriana como la p34.

125. (7702) CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A LA PROTEÍNA P34 DE MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS. MUNDO, SILVIA L.; FONTANALS, ADRIANA M (1); COLAVECCHIA, SILVIA (1); GENTILINI, ELIDA (1); HAJOS, SILVIA (2)

Facultad de Ciencias Veterinarias UBA (2) Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

La paratuberculosis es una enteritis granulomatosa crónica que afecta a bovinos, ocasionada por el *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (Map). Map puede sobrevivir y replicar dentro de macrófagos. La producción de anticuerpos es elevada en los últimos estadios de la enfermedad. Entre los componentes del Map, la proteína p34 fue identificada como inmunodominante para linfocitos B bovinos. Para determinar si los anticuerpos específicos frente a p34 pueden modular la patogénesis de Map, desarrollamos un anticuerpo monoclonal (Mab) y evaluamos su efecto sobre la interacción entre la bacteria y macrófagos bovinos. La fusión se realizó partir de un ratón inmunizado con Map y p34. Se seleccionó y subclonó un Mab de acuerdo con su reactividad por ELISA e inmunofluorescencia frente a Map. Se tipificó utilizando un kit de ELISA y se secuenciaron las regiones VH y VL utilizando RACE-PCR y RT-PCR. El efecto del Mab sobre la asociación de Map con una línea de macrófagos bovinos (BoMac) se evaluó por citometría de flujo. Se utilizaron como controles negativos sueros de bovinos sanos y un Mab irrelevante del mismo isotipo. El Mab obtenido (Map341A61) se identificó como IgG1 kappa. El VH presentó un 96% de homología con la familia de genes VHJ558 (GenBank AF303881). El VL presentó un 97% de homología con IgM MP-18-3-117 kappa light (GenBank AY005823.1). El % de incremento de asociación promedio fue de 22.29% ± 1.83%, menor al obtenido previamente utilizando anticuerpos policlonales bovinos (50.51%). El tratamiento de las bacterias con el anticuerpo monoclonal Map341A61 incrementa la asociación indicando que anticuerpos específicos contra la proteína pueden favorecer el ingreso a la célula y que el mecanismo involucrado sería a través del receptor para Fcgamma. El incremento se evaluó en un sistema heterólogo ratón x bovino, lo que confirmaría una cierta homología funcional interespecie.

126. (7956) MODULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS POR MOLÉCULAS COESTIMULATORIAS EN LA INFECCIÓN POR MYCOBACTERIUM TUBERCU-

LOSIS. MARTÍNEZ, GUSTAVO (1); PASQUINELLI, VIRGINIA (1); QUIROGA, FLORENCIA (1); CASTRO ZORRILLA, LILIANA (2); MUSELLA, ROSA (3); SAAB, MARIA (3); BALDINI, MATIAS (3); GARCÍA, VERÓNICA (1)

Departamento de Microbiología. Laboratorio de Inmunogenética. Facultad de Medicina. UBA. Instituto Vaccarezza Universidad de Buenos Aires, División Tiosioneumonología Hospital FJ Muñiz

La respuesta inmune efectiva contra micobacterias requiere producción de citoquinas Th1 por linfocitos T activados (LT). Como las moléculas coestimuladoras participan en la modulación del patrón de citoquinas producido por LT activados, investigamos el rol de moléculas inhibitorias, como CTLA-4 y PD-1, y moléculas inductoras de activación celular, como SLAM e ICOS, en la tuberculosis humana. Participaron en el estudio dos grupos de pacientes con tuberculosis: individuos de alta respuesta (AR) y baja respuesta (BR) frente a estimulación con sonificado de *M. tuberculosis* (según proliferación y producción de IFN-g). La estimulación antigénica incrementó significativamente la expresión de CTLA-4, PD-1, ICOS y SLAM en LT de pacientes AR y dadores sanos (DS), pero no modificó los niveles de estas moléculas en pacientes BR. Al evaluar el patrón de citoquinas luego del agregado en cultivo de anticuerpos específicos, se observó que la estimulación con *M. tuberculosis* o estímulo policlinal, conjuntamente con anti-CTLA-4 o anti-PD1 por 48 h, disminuyó la producción de IFN-g en DS y pacientes AR. Contrariamente, el cultivo con antígeno por 5 días y estimulación (luego de lavado de las células) con anti-CTLA-4, anti-ICOS, anti-SLAM o anti-PD-1 incrementó significativamente el IFN-g en pacientes AR y DS, pero no en pacientes BR. Más aún, la estimulación conjunta vía ICOS/CTLA-4, o vía SLAM/PD-1 indujo un incremento sinérgico en la producción de IFN-g en pacientes AR. Estos datos señalarían que CTLA-4 y PD-1 enviarían señales inhibitorias o estimuladoras, dependiendo de la presencia/ausencia de señalización vía TCR. Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que las moléculas coestimuladoras estudiadas participarían en la regulación de respuestas Th1 en tuberculosis, resultando blancos potenciales para modulación terapéutica en pacientes con infecciones por micobacterias.

127. (8013) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD31 Y SAP EN LINFOCITOS T DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS ACTIVA. QUIROGA, F (1); PASQUINELLI, V (1); MARTÍNEZ, G (1); MUSELLA, R (2); CASTRO ZORRILLA, L (3); ALVES, L (2); ROLDÁN, N (2); CHULUYAN, E (1); GARCÍA, V (1)

Departamento de Microbiología. Laboratorio de Inmunogenética. Facultad de Medicina. UBA División Tiosioneumonología Hospital FJ Muñiz, Instituto Vaccarezza Universidad de Buenos Aires

La producción de IFN-g por linfocitos T (LT) es crucial en la inmunidad contra *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Recientemente demostramos que la expresión de la proteína de unión a SLAM (SAP) correlaciona inversamente con la producción de IFN-g en pacientes con tuberculosis. Asimismo, ha sido propuesto que SAP podría unirse a la cola citoplasmática de CD31 (PECAM-1), una molécula transmembrana expresada en la superficie de células endoteliales, plaquetas, monocitos, neutrófilos y una subpoblación de LT. Más aún, la señalización vía CD31 inhibe la transducción de señales vía TCR. En este trabajo se investigó la expresión de CD31 y SAP en LT de pacientes con tuberculosis activa (TB) a fin de determinar el rol de ambas moléculas en la regulación del patrón de citoquinas en la infección por MTB. Participaron en el estudio dos grupos de pacientes con tuberculosis: individuos de alta y baja respuesta (AR y BR, respectivamente) frente a estimulación con sonificado de MTB (según proliferación y producción de IFN-g). *M. tuberculosis* incrementó la expresión de CD31 en superficie de LT de pacientes con TB. Sin embargo, en dadores sanos (DS), la estimulación

antigénica disminuyó la expresión de la molécula en la superficie de LT. Al investigar la expresión de CD31 y SAP por western blot en células mononucleares luego de estimulación con MTB, se observó una disminución en la expresión de CD31 en DS y ausencia de expresión de SAP. Contrariamente, en pacientes BR, *Mtb* incrementó tanto la expresión de CD31 como de SAP, mientras que en pacientes AR, la estimulación antigénica incrementó CD31 pero no se detectó expresión de SAP. Los resultados obtenidos sugieren un rol potencial de CD31 en la patogénesis de la TB. Así, la posible interacción entre CD31 (una molécula inhibitoria en la activación de LT) y SAP (un factor inhibitorio de IFN-g), podría iniciar una cascada de señalización que regula la producción de IFN-g en pacientes con TB.

128. (8112) ROL DEL SUBSET NK CD56BRIGH EN EL DIRECCIONAMIENTO TH1 DE LA RESPUESTA CONTRA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (MTB): PRODUCCIÓN DE IFNG EN EL SITIO DE INFECCIÓN. SCHIERLOH, PABLO(1); YOKOBORI, NOEMÍ(1); ALEMÁN, MERCEDES(1); BEIGIER, MACARENA(1); MUSELLA, ROSA(2); ABBATE, EDUARDO(2); SASIAIN, MARÍA(1); DE LA BARRERA, SILVIA(1)

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina. División Neumonología, Hospital Muñiz

La producción temprana de IFNg durante la infección por micobacterias es crucial para la evolución de la respuesta hacia Th1. En el contexto de la inmunidad innata contra *Mtb*, 2 tipos celulares han sido señalados como posibles productores de IFNg: las células Tg/d y NK. En este trabajo caracterizamos fenotípica y funcionalmente las NK (CD3-CD56+) presentes en el sitio de infección analizando expresión y modulación de moléculas en células de derrames pleurales (LP) obtenidos por toracocentesis y sangre periférica (SP) de pacientes con tuberculosis (n=10) por citometría de flujo. Nuestros resultados demuestran una disminución del % total de células CD3-CD56+CD16+ en LP respecto de SP (5±1 vs 24±4, p<0,008) con aumento del subset CD56brigh (productor de citoquinas) en LP (%: 40±5 vs 0,7±0,4, p<0,007). Más aún, marcadores fenotípicofuncionales estrechamente asociados a NK CD56brigh o CD56dim en LP confirman esta observación (disminución de %CD16+, p<0,009; aumento de %CD62L+ y NKG2A/CD94+, p<0,05). Además, NK de LP tienen mayor expresión (intensidad media de fluorescencia, MIF) de TLR2 (p<0,05) y marcadores de activación (CD69+ p<0,007 y HLA-DR+). El % de células y MIF de CD3-CD56+IFNg+ espontáneo e inducido por *Mtb* es mayor en LP, al tiempo que no se detectó IL-10 inducida o espontánea en NK de SP o LP. Estos resultados sugieren una extravasación selectiva al foco de infección del subset productor de citoquinas (CD3-CD16-/lowCD56brigh) en detrimento del que media citotoxicidad (CD3-CD16+CD56dim), pudiendo tener implicancias en etapas tempranas impidiendo la lisis del reservorio de *Mtb* y modificando el perfil de la respuesta adaptativa contra *Mtb*. Finalmente, el aumento de TLR2 en LP es consistente con el nuevo paradigma que postula la posibilidad de activación directa (independiente de CPA) de la NK por medio de moléculas asociadas a patógenos.

INMUNOLOGÍA 2: INMUNOENDOCRINOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN

129. (6655) ACCIÓN DE LA METFORMINA (N-N'DIMETIL BIGUANIDA) EN EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO. SANDER, VALERIA; ELÍA, EVELIN; LUCHETTI, CAROLINA; SOLANO, EMILIA; GUTIERREZ, MARIANA; DI GIROLAMO, GUILLERMO; GONZALEZ, CLAUDIO; MOTTA, ALICIA

CEFYO. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA

A pesar de la eficacia de la metformina (M): N-N'-dimetil biguanida en el tratamiento del Síndrome del Ovario Poliquístico (PCOS), aún no se conoce el alcance de su mecanismo de acción. El objetivo del trabajo fue estudiar el rol de la M sobre la relación sistema endocrino/ inmune en el ovario durante el desarrollo de PCOS y como consecuencia, en la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) citoquina descripta anormalmente incrementada en dicha patología. En ratones prepúberes de la cepa BALB/c se indujo PCOS luego de la inyección sc diaria de 6 mg/100 g de peso de dehidroepiandrosterona (grupo D) durante 20 días. Otro grupo fue inyectado con D y además tratado en forma oral (por cánula) con M: 50 mg/Kg peso (grupo D+M), ambos administrados en forma diaria durante 20 días. El tercer grupo recibió vehículo: control (grupo C). La M reestableció la morfología ovárica y previno la formación de quistes, determinado por tinción con hematoxilina - eosina, mejorando además, el aspecto nuclear evaluado por coloración por el método de Hoescht. Más aún, la M normalizó la expresión de linfocitos T CD4+ y CD8+ (determinados por citometría de flujo) en ganglios drenantes de ovario. Los resultados en % para T CD4+ y CD8+ respectivamente fueron: C=46 \pm 4 y 44 \pm 8; D=24 \pm 6 y 64 \pm 4; D+M=40 \pm 7 y 38 \pm 8. La producción de TNF α sérica cuantificado por radioinmunoensayo (RIA) recobró los valores normales luego del tratamiento con M (C=110 \pm 3; D=129 \pm 7; D+M=103 \pm 7 pg/ml suero). Asimismo, mientras que la glucosa (gl) sérica no varió en los tres grupos, la insulina (In) evaluada por RIA, aumentó con D y se revirtió parcialmente con M (C=38 \pm 5; D=159 \pm 19, D+M=84 \pm 15 μ U/ml suero). La M mejoró parámetros endocrinos e inmunes y así la morfología y la funcionalidad ovárica. Como la gl no varió, se describe una novedosa acción de M, no como anti hipergluceante, sino como droga capaz de normalizar los niveles de In, reguladora de la esteroidogénesis.

130. (6656) LA METFORMINA (N-N'DIMETIL BIGUANIDA) Y EL ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO. ELÍAS, EVELIN; SANDER, VALERIA; SOLANO, EMILIA; LUCHETTI, CAROLINA; GUTIERREZ, MARIANA; DI GIROLAMO, GUILLERMO; GONZALEZ, CLAUDIO; MOTTA, ALICIA B

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO) CONICET. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA

La metformina (M): N-N'-dimetil biguanida mejora parámetros del estrés oxidativo en pacientes con diabetes 2 disminuyendo así el riesgo cardiovascular. Ya que la diabetes tipo 2 puede estar asociada con el Ovario Poliquístico (PCOS) y la M es utilizada en el tratamiento de PCOS, el objetivo fue estudiar si la M era capaz de regular parámetros del estrés oxidativo en ovarios quísticos. Ratones prepúberes BALB/c fueron inducidos a PCOS luego de 20 días de inyección sc diaria de 6 mg/100 g de peso de dehidroepiandrosterona (grupo D). Otro grupo fue inyectado con D y además tratado en forma oral (por cánula) con M: 50 mg/Kg peso (grupo D+M), ambos administrados en forma diaria durante 20 días. El tercer grupo recibió vehículo: control (grupo C). En los sueros provenientes de dichos grupos se determinó por RIA: progesterona (P) y estradiol (E) y en los ovarios el índice de peroxidación lipídica mediante el malondialdehído (MDA) formado. Como antioxidantes: la actividad de la catalasa (CAT: enzima responsable del pasaje de H(2)O(2) a H(2)O) y la formación de glutatión (GSH). Encontramos que la M normalizó los niveles de E aumentados por D (C=6,2 \pm 2,5; D=29 \pm 2; D+M=10,2 \pm 3,0 ng/ml suero), pero no tuvo efecto sobre el aumento de P por D (C=1,5 \pm 0,2; D=2,6 \pm 0,4; D+M=2,5 \pm 0,3 ng/ml suero). La M no pudo modificar el incremento de MDA producido por D (C=909 \pm 132; D=1922 \pm 157; D+M=1890 \pm 132 μ mol MDA/gr tejido) ni revertir la disminución de CAT producida por D (C=0,18 \pm 0,06; D=0,11 \pm 0,01; D+M=0,10 \pm 0,02 pmoles/mg proteína) pero actuó reestableciendo los niveles del antioxidante GSH (C=0,66 \pm 0,01; D=0,48 \pm 0,08; D+M=0,66 \pm 0,09 μ M/ mg proteína). Concluimos que la M actuó

sobre el estrés oxidativo en forma selectiva: no reguló la formación de especies reactivas del oxígeno ni la actividad de CAT pero sí de GSH y aún así, reguló E. El hecho que la M no modificó la P indicaría otra vía de regulación que no fue establecida con este tratamiento.

131. (6850) MENOR ACTIVIDAD DE NOS Y PRODUCCIÓN DE PROSTAGLANDINA E2 EN EL ÚTERO DE RATONES NOD PREDIABÉTICOS. ROCA, VALERIA ; LARocca, LUCIANA; AISEMBERG, JULIETA; FRANCHI, ANA; PÉREZ LEIRÓS, CLAUDIA

Depto Química Biológica FCEN UBA-CONICET. CEFYO-CONICET

Los ratones diabéticos no obesos (NOD) son un modelo de respuestas Th 1 espontánea con características similares al Síndrome de Sjogren. El óxido nítrico participa en distintos procesos relacionados con la preñez como son la ovulación, el transporte embrionario, la implantación y la quiescencia uterina. Otro mediador importante es la prostaglandina E2 (PGE2) que también participa en los procesos de ovulación, fecundación y en el parto. En los ratones NOD observamos una disminución de la tasa de natalidad a partir de la segunda parición con respecto a otras cepas normales endocriadas que llega al 20-30% de neonatos en la tercera preñez. En trabajos previos describimos la pérdida de actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en otros tejidos (glándulas exócrinas). El objetivo de este trabajo fue investigar la actividad de NOS y la producción de prostaglandinas (PG), en el útero de ratones NOD y BALB/c en los distintos estadios del ciclo estral. Se midió la actividad de NOS por conversión de L-(14C)arginina en citrulina y las PG por RIA. Los úteros de ratones NOD presentaron una menor actividad de NOS con respecto a los BALB/c durante el ciclo estral (P<0.01 NOD vs BALB/c). Además, en los BALB/c se observó un pico de actividad en proestro (P <0.05 proestro vs otros estadios) mientras que en NOD no se observó dicha variación. Los ratones NOD presentaron menor producción de PGE2 que los BALB/c en el estadio estudiado (P<0.05). Los resultados indican que al menos dos mediadores importantes en la preñez se encuentran alterados en el útero de los ratones NOD. Este hecho podría estar relacionado con las alteraciones reproductivas observadas en esta cepa.

132. (6953) IMPACTO DE LA HEMODILUCIÓN EN RECUENTOS LEUCOCITARIOS Y NIVELES DE CORTISOL, PROLACTINA E IL-6. COMPARACIÓN ENTRE DOS TÉCNICAS ANESTÉSICAS EN COLECISTECTOMÍAS VIDEOLAPAROSCÓPICAS (CVL). GRAZIOLA, ENZO; RIGAT, MARINA (2); COLUCCI, DARÍO (2); ELENA, GUSTAVO (2); PUIG, NORA (2)

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

El estrés anestésico-quirúrgico produce numerosas modificaciones neuroendócrinas, metabólicas e inmunológicas. Los aportes hidroelectrolíticos durante la cirugía dependen del método anestésico utilizado. Por ello, en CVL con anestesia total endovenosa (E) o inhalatoria (Inh) se comparó la hemodilución y su efecto sobre recuentos de leucocitos, cortisol, prolactina e interleucina (IL) 6 sérica. Pacientes programados para CVL a las 7:30 AM, 20-65 años, ASA I: Grupo E: propofol, remifentanil y vecuronio (n=14), Grupo Inh: propofol, fentanil e isoflurano (n=13). En muestras de sangre: basal, intraoperatoria (I.O.), 1er y 7º día postoperatorio, se realizó hemograma, recuentos linfocitarios (CD3, CD4, CD8 y CD20), nivel sérico de cortisol, prolactina e IL 6. Se ajustaron los valores al hematocrito basal según la fórmula de Taylor (Clin Exp Immunol 1999;118:242): Valor ajustado = Valor de la variable x Hematocrito del momento en estudio/ Hematocrito basal y se compararon los valores con y sin ajuste por test no paramétricos. Sólo pacientes del grupo E disminuyeron significativamente el hematocrito con respecto al basal

(media±d.e: 39.2±5.6), en el IO (35.9±5.2, p<0.002) y en el 1er día posquirúrgico (36.9±4.3, p<0.05). El ajuste por hemodilución reveló diferencias significativas en el IO en el porcentaje de neutrófilos (E: 74.7±12, Inh: 61.7±12; p<0.05) y de LCD4+ (E: 53.2±11, Inh: 41.5±15; p<0.025) que no se habían identificado en los datos originales, mientras que no modificó la información relativa al resto de las determinaciones analizadas. Dado que en el grupo que recibió anestesia endovenosa la caída del hematocrito fue sistemática, aunque pequeña, el ajuste de los datos permitió revelar efectos diferenciales de los métodos anestésicos sobre células del sistema inmunitario durante el intraoperatorio.

133. (7028) CONSECUENCIAS PATOGENICAS SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN DE UNA RESPUESTA AUTOINMUNE HACIA ANTIGENOS PROSTATICOS. MOTRICH, RUBEN DARIO (1); GATTI, GERARDO (1); PONCE, ANDRES (2); MACKERN, JUAN PABLO (1); RIERA, CLELIA (1); MACCIONI, MARIANA (1); RIVERO, VIRGINIA ELENA (1)

Inmunología - CIBICI-CONICET - Fac. de Cs. Qcas. - Universidad Nacional de Córdoba. Instituto de Fisiología, Fac. de Medicina, Universidad Nacional de Córdoba

Recientemente, describimos que pacientes con prostatitis autoinmune y ratas con prostatitis autoinmune experimental presentan importantes alteraciones en semen. Con el fin de indagar sobre los mecanismos implicados se indujo autoinmunidad contra próstata en ratas Wistar macho mediante inmunización con Extracto Prostático (Grupo EP), Prostateína (Grupo PSBP) y diluyente (Grupo C) incorporados a adyuvante. Se realizaron estudios en muestras de semen obtenidas por electroyacuación y en espermatozoides de epidídimo. Los grupos EP y PSBP presentaron respuesta linfoproliferativa y humoral anti antígenos prostáticos y lesión sólo en próstata. El análisis de semen reveló una disminución significativa en la concentración, motilidad, vitalidad e integridad de membrana de los espermatozoides (p<0.01), sólo en los animales autoinmunes. El análisis de los espermatozoides epididimarios no mostró diferencia alguna entre los grupos estudiados. Al analizar la presencia de apoptosis en espermatozoides, se observó un notable incremento de apoptosis en espermatozoides seminales: 84.26% en EP (p<0.01) y 40.62% en PSBP (p<0.01). No se observó diferencia alguna en los niveles de apoptosis de espermatozoides epididimarios de los distintos grupos estudiados. Al evaluar la función de próstata, vesículas seminales y epidídimo, mediante ácido cítrico, fructosa y a-glucosidasa respectivamente; se observó una disminución en los niveles de ácido cítrico sólo en los grupos EP y PSBP, confirmando que solo próstata estaba afectada. Para indagar sobre la presencia de inflamación local, evaluamos los niveles de Oxido Nitrico (NO) y TNF-a en plasma seminal, observando un incremento significativo sólo en los animales autoinmunes (p<0.05). Estos resultados confirman que una respuesta inflamatoria autoinmune dirigida y restringida a próstata, es capaz de alterar significativamente la calidad espermática de un individuo, pudiendo comprometer su fertilidad.

134. (7190) ALTERACIONES HORMONALES DURANTE EL PERIODO DE RECUPERACIÓN EN RATAS MALNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA. FELEDI, C.; SOSA, Y.; GOYA, R.; MASSOUH, E.

Inmunquímica, Dto. Química Biológica, FCEyN, UBA. Histología y Embriología «B», Medicina, UNLP e Inst. Investigaciones Bioquímicas (INIBIOLP)

Las ratas desnutridas durante la lactancia por duplicación de camada presentan una inmunodeficiencia secundaria que se prolonga más allá de la recuperación ponderal. Dada la importante influencia de la malnutrición sobre las funciones del timo, el objetivo del presente trabajo es determinar el grado de compromiso endócrino resultante en este modelo. En sueros de ratas normales y desnutridas en recuperación, se dosaron dos hormonas

peptídicas de origen no hipofisario: la timulina (FTS-Zn, de células epiteliales tímicas, por el bioensayo de rosetas), y la somatomedina, (IGF-1, de células mesenquimáticas, por Radioinmunoensayo), entre el destete y los cuatro meses de edad. Se observa que la Timulina, que regula procesos de proliferación y diferenciación intratímicos, está significativamente disminuida al destete (N21=139fg/ml vs D21=24fg/ml, p=0.0013), aun en presencia de concentraciones normales de Cinc sanguíneo (N21=6.9±2mg/l vs D21=9.3±4mg/l, p= n.s.), pero se normaliza tras una semana de renutrición (N28=160±64 vs D28=112±32, p= n.s.). Su decrecimiento con la edad (N28=160 vs N50=35, p= 0.0006, y D28=112 vs D50=17.3, p= 0.01) presenta cinética similar en ambos grupos. La Somatomedina, que regula la entrada al ciclo celular, es normal al destete en los D, pero disminuye luego: (N50=900±293 ng/ml vs D50=519±256 ng/ml, p= 0.0068, y N70=1093±235 ng/ml vs D70=541±212, p=0.0008). Paralelamente, por citometría de flujo se observó que las subpoblaciones de timocitos CD4-CD8+, precursores de Dobles Positivas (DP), las DP sujetas a selección, y las maduras simples positivas (sp) spCD4+ y spCD8+ están disminuidas después de los 50 días de edad en el timo de los desnutridos, a pesar de que éste se encuentra globalmente repoblado después de un mes de renutrición con dieta standard. Concluimos que los procesos dependientes de las células epiteliales tímicas podrían estar alterados al destete, pero además, la persistente disfunción de la secreción de IGF-1 podría afectar el desarrollo a largo plazo de los timocitos.

135. (7234) VALOR CLINICO DE LA LOCALIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE ANTIESPERMATOZOIDE EN REPRODUCCION HUMANA. BRUFMAN, ADRIANA; BOUVET, BEATRIZ; PAPARELLA, CECILIA; CHAINGAM, CHANTHANA; GATTI, VANDA; SOLIS, EDITA

Dto. Bioquímica Clín. Fac. de Ciencias Bioq. y Farm. U.N.R. 2000. Rosario

Dentro de la evaluación inmunológica de la pareja infertil, el estudio de anticuerpos antiespermáticos (AAE) es uno de los de mayor importancia desde el punto de vista clínico (Mardesic, 2000, Naz, 2004). Pueden encontrarse AAE en la membrana de los espermatozoides, libres en plasma seminal (PS), en suero del hombre o suero de la mujer (isoanticuerpos). Nuestro objetivo fue estudiar la presencia y localización de AAE para lograr una mejor evaluación diagnóstica de la pareja infertil. Se realizó un estudio retrospectivo de 213 parejas que consultaron por infertilidad en los Servicios de Reproducción del Hosp. Esc. «Eva Perón» de Gr. Baigorria y Hosp. Centenario de Rosario desde mayo de 2002 hasta mayo de 2004. Se trabajó con muestras de suero de ambos miembros de la pareja y semen. Se estudió la presencia de AAE tipo IgG con Tac II método de aglutinación mixta desarrollado y validado por nuestro equipo de trabajo (Gatti, 1998). De las 213 parejas estudiadas, 59 (27,6%) presentaban AAE en alguna de las 4 muestras: 21 (35,5%) en espermatozoides solos, 15 (25,4%) en plasma seminal, 6 (10,1%) en suero del hombre, 4 (6,7%) en suero de la mujer y 13 (22,0%) en más de una muestra. Los resultados obtenidos demuestran que los AAE no siempre se encuentran en espermatozoides y sí en otros fluidos biológicos.

Muestra	Localización de la respuesta inmune				
	Espermatozoides	Plasma seminal	Suero hombre	Suero mujer	AAE en dos o mas muestras
Total n= 59	21 (35,6%)	15 (25,4%)	6 (10,2%)	4 (6,8%)	13 (22,0%)

Concluimos que es importante realizar la determinación de anticuerpos antiespermáticos en distintas muestras biológicas para no perder una valiosa información y optimizar la conducta terapéutica a seguir. Este trabajo ha recibido el apoyo de la Beca «Ramón Carrillo-Arturo Oñativia» del Ministerio de Salud de la Nación, Convocatoria 2004.

136. (7268) ISOANTICUERPOS ANTIESPERMÁTICOS EN MUJERES INFERTILES DIABÉTICAS Y NO DIABÉTICAS.
BRUFMAN, ADRIANA; UMANSKY, MIRIAN

Servicio De Reproduccion Humana-Hospital Escuela Eva Peron.Gr. Baigorria

Según la bibliografía consultada, la presencia de anticuerpos antiespermáticos en mujeres infértiles (isoanticuerpos) oscila entre 9 a un 15% (Putowsky, 2004; Eggert-Kruse, 1989). Considerando la diabetes como una patología autoinmune y que los casos de infertilidad son frecuentes en dichas patologías se estudió la presencia de isoanticuerpos antiespermáticos en pacientes diabéticas que consultaron por infertilidad. El objetivo de este trabajo fue relacionar la presencia de anticuerpos antiespermáticos en mujeres diabéticas infértiles con los valores de la población femenina infértil no diabética. Se seleccionaron 183 pacientes que consultaron por infertilidad en el Servicio de Reproducción Humana del Hospital Escuela «Eva Perón» con edad promedio 30 ± 11 Grupo A (pacientes no diabéticas (n=155).Grupo B: Pacientes diabéticas (n= 28), 20 no insulino dependientes (NID) y 8 insulino dependientes (ID) sin complicaciones y con diversos tiempos de evolución. En ambos grupos se estudió la presencia de anticuerpos antiespermáticos en suero tipo IgG con el método indirecto de aglutinación mixta TAC II (Gatti, 1998) considerando positivo valores mayores a un 20% de espermatozoides aglutinados. La comparación de los 2 grupos se realizó utilizando la técnica no paramétrica de Mann-Whitney para muestras independientes por no cumplirse los supuestos para la aplicación del test paramétrico (test t). El análisis estadístico demostró un aumento significativo de anticuerpos antiespermáticos en diabéticas ID e NID con respecto a las no diabéticas. En base a los resultados obtenidos se concluye que existe un aumento de causas posibles de infertilidad por procesos inmunes en pacientes diabéticas con respecto a las no diabéticas debido tal vez a una base genética alterada. Este trabajo ha recibido el apoyo de la Beca «Ramón Carrillo-Arturo Oñativia» del Ministerio de Salud de la Nación, Convocatoria 2004.

137. (7523) EXPRESIÓN EPITELIAL DE TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4) EN PRÓSTATA VENTRAL DE RATA.
QUINTAR, AMADO; DE PAUL, ANA; AOKI, AGUSTIN; MALDONADO, CRISTINA

Centro de Microscopia Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

Recientes evidencias indican que las células epiteliales son capaces de producir una variedad de moléculas para la defensa del huésped. Entre éstas, el TLR4, es un receptor de membrana que participa en el reconocimiento de componentes bacterianos y cuya activación produce la liberación de péptidos antimicrobianos y citoquinas que inician la respuesta inmune. Por la importancia de los procesos inflamatorios en la próstata, este trabajo tuvo como objetivo investigar la presencia de TLR-4 en modelos experimentales en este órgano y su modulación por testosterona y por inflamación bacteriana. Se utilizaron ratas Wistar adultas, divididas en los siguientes grupos: a) 10 días postcastración, b) 10 días con testosterona (2,5 mg/rata/día) en animales castrados en el día 1, c) 48 h postinoculación intraprostática de *E. coli* en animales intactos. En los controles se usaron animales inoculados con el correspondiente vehículo. Se extrajo la próstata ventral para analizar la existencia de TLR4 mediante inmunocitoquímica a nivel óptico y electrónico y por Western Blot. En animales controles se detectó la presencia de TLR4 por Western Blot, y por inmunocitoquímica se obtuvo un patrón citoplasmático difuso en las células del epitelio glandular. La expresión del receptor fue levemente elevada por testosterona, sin embargo, el aumento más notable fue observado en animales castrados (ANOVA $p < 0,05$). La infección bacteriana produjo una fuerte estimulación de células epiteliales, con incremento de la expresión de TLR4, tanto por inmunocitoquímica como por Western Blot (ANOVA $p < 0,01$). Estos resultados demuestran, en primer término, que las células prostáticas

expresan TLR4. Además, los niveles de testosterona no parecen ser críticos para su modulación. Es probable que el incremento del receptor durante la castración sea disparado por citoquinas proinflamatorias cuya activación es fisiológicamente suprimida por testosterona. El aumento de TLR4 por la infección pone de manifiesto el rol que juega el epitelio en la patogénesis inflamatoria.

138. (7700) MODULACION IN VITRO DE UDP-GLUCOSA-GLUCOSIL TRANSFERASA POR ESTROGENOS Y PROGESTERONA. PRADOS, MB; MIRANDA, S; MARGNI, R

IDEHU (CONICET UBA)

Los anticuerpos asimétricos (AcA) constituyen uno de los factores fundamentales que intervienen en la tolerancia del feto en el útero materno. En trabajos preliminares se ha demostrado que la IL-6 es responsable de su síntesis y que su acción es mediada por la UDP-glucosa-glicosil transferasa (GT) presente en el retículo endoplásmico. Por otro lado, hemos observado que estrógeno (E2) y progesterona (Pg) son capaces de modular la síntesis de AcA y la producción de IL-6 in vitro. El objetivo del presente trabajo es analizar la influencia de E2 y Pg sobre la actividad GT in vitro. Para ello, se cultivó un hibridoma de ratón productor de anticuerpos simétricos y AcA anti-DNP en ausencia (control) o en presencia de distintas dosis de Pg y E2 durante 48hs. Se determinó la presencia de AcA en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. La actividad GT fue determinada en las fracciones microsomales aisladas midiendo la incorporación de UDP(14C)-Glc sobre tiroglobulina desnaturalizada, como fuera descripto por Parodi y col. La tabla muestra la variación de la actividad promedio de GT y de la producción promedio de AcA en los distintos tratamientos respecto del control, correspondientes a 3 ensayos.

Hormona	Concentración (M)	Variación GT	Variación % AcA
Pg	10(-6)	-57	-50
	10(-7)	0	0
	10(-9)	-17	-21
E2	10(-8)	-62	-24

Estos resultados indican que E2 y Pg modulan la actividad GT in vitro en forma variable dependiendo de la concentración empleada. Se sugiere que Pg, en el rango de concentraciones analizadas, regularía la producción de AcA a través de la modulación de la síntesis de IL-6 y de la actividad GT. Por el contrario, el efecto de E2 estaría influenciado por otros factores.

INMUNOLOGÍA 3: PROLIFERACIÓN, APOPTOSIS Y MUERTE CELULAR EN EL SISTEMA INMUNE

139. (6641) FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y CROMATINA EN LA INHIBICIÓN POR AMP CICLICO Y GLUCOCORTICOIDES DE LA INDUCCIÓN DE FAS LIGANDO ASOCIADA A APOPTOSIS T. REFOJO, DAMIÁN; LIBERMAN, ANA ; ARZT, EDUARDO

Lab de Fisiología y Biología Molecular. Dept. de Fisiol, Biol Mol y Cel, FCEN, UBA. Ifibyne-CONICET.

cAMP y GC bloquean la apoptosis inducida por activación T. Transfecciones con genes reporteros en hibridomas T demostraron la importancia de NF-KB y Erk1/2 como blancos de la inhibición por cAMP y GC ($p < 0,05$), así como de PKA y CREB en la mediación de los efectos de cAMP. Además ambos ligandos bloquean la expresión de FasL. Para dilucidar los sitios de acción sobre FasL, realizamos transfecciones con promotores de FasL río arriba del gen de luciferasa y sorprendentemente cAMP y GC potenciaron el efecto inductor del TCR sobre los promotores ($p < 0,01$). Para entender si cAMP y GC inhiben verdaderamente la transcripción de FasL endógeno o afectan en realidad su esta-

do estacionario realizamos experimentos de μ -intrinsic real time PCR-. cAMP y GC inhibieron significativamente ($p < 0.05$) la transcripción en sí misma. Así, tales discrepancias permiten asumir dos hipótesis posibles: el promotor endógeno del TCR requiere de un enhancer lejano (ausente en todas las construcciones clonadas hasta hoy y blanco de inhibición por GC y cAMP) o el menor grado de cromatinización plasmídica en tranfecciones transientes otorga accesibilidad a factores dependientes de cAMP y GC que no tienen acceso sobre el gen endógeno. Para comprobarlas realizamos líneas estables portando el gen reportero de FasL y observamos que en estas líneas cAMP y GC inhiben la actividad del promotor, demostrando la inhibición por cAMP y GC del gen de FasL requiere de una composición cromatínica precisa y no de enhancers a distancia. Conclusion: La inhibición por GC y por cAMP (PKA y CREB dependiente) de la apoptosis inducida por activación T se asocia a la inhibición de la activación de NF-KB y Erk1/2, al bloqueo de la inducción transcripcional de FasL, y depende críticamente de la estructura cromatínica del gen de FasL.

140. 6745 EL TNF-ALFA COMO MEDIADOR DE LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES (CG) EN LA ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (OAE). THEAS, MARÍA SUSANA ; RIVAL, CLAUDIA; GUAZZONE, VANESA ; JARAZO-DIETRICH, SABRINA; LUSTIG, LIVIA

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. UBA.

La OAE se caracteriza por la apoptosis de las CG y por un aumento del número de macrófagos y de linfocitos en el intersticio testicular. Previamente, hemos demostrado la expresión del TNFR1 y el aumento de la actividad de la caspasa 8 en las CG apoptóticas y la expresión del TNF- α en los macrófagos testiculares (MT). El objetivo de este trabajo fue determinar la participación del TNF- α y de los MT en la apoptosis de las CG y estudiar la activación de la vía apoptótica mitocondrial. La OAE fue inducida en ratas por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes (grupo OAE). Las ratas del grupo control (CTRL) fueron inyectadas sólo con adyuvantes. El TNF- α (50ng/ml) in vitro, disminuyó la viabilidad celular (MTS, C:100.01 \pm 0.01, TNF- α :74.32 \pm 7.78 $p < 0.05$; azul tripán, C:82.11 \pm 2.61, TNF- α :66.93 \pm 2.39% $p < 0.01$) e indujo apoptosis (ISEL) de las CG (C:11.82, TNF- α :44.39% CG ISEL+ $p < 0.01$). El contenido de TNF- α (ELISA) fue mayor en los medios condicionados (MC) provenientes de MT de ratas con OAE respecto de los MC de ratas CTRL (MCMT/CTRL:6.86 \pm 0.17, MCMT/OAE:13.95 \pm 1.25 pg/10(4)células $p < 0.01$). A su vez, el MCMT/OAE redujo la viabilidad (MTS) de las CG aisladas de testículos de ratas con OAE (MCMT/CTRL:104.60 \pm 3.36, MCMT/OAE:87.80 \pm 4.49 $p < 0.01$). El contenido del citocromo c (Western blot) aumentó en la fracción testicular citosólica (FC) y disminuyó en la mitocondrial (FM) de ratas con OAE respecto de las CTRL (FC: CTRL:160.03 \pm 15.38, OAE:527.52 \pm 61.67*; FM: CTRL:591.14 \pm 65.29, OAE:333.10 \pm 31.63* $p < 0.05$). La actividad de la caspasa 9 (método colorimétrico) fue mayor en las CG de ratas con OAE respecto de las CTRL (CTRL:93.5 \pm 5.46, OAE:112.5 \pm 6.07 $p < 0.05$). Los resultados sugieren que en la OAE los macrófagos del intersticio testicular estarían involucrados en la apoptosis de las CG y que el TNF- α sería uno de los mediadores de este proceso. Por otro lado, demostramos que la vía apoptótica mitocondrial interviene en la apoptosis de las CG en este modelo.

141. (6864) ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LIMONENO, AISLADO DE UN EXTRACTO OBTENIDO A PARTIR DE LAS FLORES DE TILIA CORDATA, SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS TUMORALES Y NORMALES. ANESINI, CLAUDIA; BARREIRO ARCOS, MARIA LAURA (1); CREMASCHI, GRACIELA (1); FERRARO, GRACIELA

IQUIMEFA-UBA-CONICET; (1) CEFYBO-CONICET

Extractos obtenidos a partir de las flores de especies de Tilia son utilizados como ansiolíticos y en resfrios y ronquitis. En trabajos previos demostramos que, un extracto diclorometánico

(CME) a partir de las flores de Tilia cordata Mill., presentó acción antiproliferativa selectiva sobre una línea de linfoma murino (BW 5147)(LT) sin afectar la viabilidad de linfocitos murinos normales (LMN). A través de sephadex, se purificó del extracto CME una fracción rica en terpenos, (F6), que presentó acción antiproliferativa selectiva sobre los LT. El objetivo del presente trabajo fue: aislar e identificar los compuestos presentes en F6 y analizar el efecto de los principios aislados sobre la proliferación de LT y LMN. El efecto sobre la proliferación celular fue determinado a través de la variación en la captación de timidina tritiada. La identificación de los terpenos se realizó por TLC y cromatografía gaseosa. El monoterpeno limoneno (L) fue identificado y aislado de la fracción F6. L presentó acción antiproliferativa sobre LT y sobre LMN estimulados con concanavalina A (Con A). Los resultados fueron expresados como concentración efectiva media (CE50) (Media \pm ESM). Sobre las células tumorales: (CE50) μ g/ml: 35 \pm 2.0; la viabilidad celular disminuyó con concentraciones superiores a 10 μ g/ml, observándose apoptosis con bajas concentraciones y necrosis a altas concentraciones, efectos relacionados con un aumento en los niveles de oxido nítrico. Sobre las células normales: CE50 μ g/ml: 72 \pm 5.0. Sobre LMN sin estimulación con ConA, L incrementó la proliferación celular: Índice de estimulación (IS) (L 10 μ g/ml: 25 \pm 1.0%; L 40 μ g/ml: 41 \pm 0.9%; L 60 μ g/ml: 58.5 \pm 3%). L presentó una acción antiproliferativa selectiva sobre LT, ejerciendo efectos citostáticos y citotóxicos dependiendo de la concentración, que se relacionan con apoptosis y necrosis celular y con el oxido nítrico.

142. (6987) LA GLICOSILACIÓN DIFERENCIAL REGULA LA SOBREVIVENCIA DE LINFOCITOS TH1/TH2 HUMANOS. TOSCANO, MARTA; ILARREGUI, J; RUBINSTEIN, N.; BIANCO, G.; FAINBOIM, L.; ZWIRNER, N.; RABINOVICH, G.

Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas «José de San Martín». Facultad de Medicina. UBA.

Recientemente hemos demostrado, en diferentes modelos experimentales, que Gal-1 es capaz de inducir un desvío de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 y que linfocitos Th2 polarizados in vitro son resistentes a la apoptosis inducida por Gal-1. El objetivo del presente trabajo fue investigar los mecanismos moleculares que regulan la susceptibilidad diferencial de linfocitos Th1/Th2 a la apoptosis inducida por Gal-1. A tal fin linfocitos CD4+ fueron activados con PHA e IL-2 y cultivados por 5 días en condiciones polarizantes Th1 (IL-12; anti-IL-4) o Th2 (IL-4; anti-IL-12). Se analizó la unión de Gal-1 a dichas células y se observó que linfocitos Th2 unen Gal-1 en menor grado que linfocitos Th1 ($p < 0.05$). Posteriormente se estudió el estado de glicosilación de linfocitos Th1 y Th2 utilizando lectinas vegetales biotiniladas (SNA, MAA y PNA) y un AcMo anti-core-2-O-glicanos (1D4). Se observó que linfocitos Th2 presentan un incremento de ácido siálico (AS) en posición alfa2,6 en N-glicanos y alfa2,3 en core-1-O-glicanos respecto a linfocitos Th1 ($p < 0.05$). Utilizando ensayos de Western blot se observó un incremento de la enzima ST6Gal I, responsable de la adición de AS alfa2,6 a N-glicanos, en células Th2. Para demostrar una relación causal entre la sialilación y la resistencia a la apoptosis inducida por Gal-1, las células fueron tratadas con sialidasas específicas y se observó que la remoción de AS alfa2,6 de linfocitos Th2 provoca un aumento de la unión de Gal-1 y un incremento en la apoptosis inducida por esta proteína ($p < 0.05$). Finalmente se demostró que el aumento de AS alfa2,6 en linfocitos Th2 requiere de la activación celular y la presencia de IL-4. A su vez se determinó que este fenómeno depende de la activación de las quinasas JAK2/3 y ERK. Este trabajo provee evidencias de un nuevo mecanismo, basado en la glicosilación diferencial, a través del cual es posible modular la supervivencia de linfocitos Th1/Th2 con las consecuentes implicancias en la homeostasis de la respuesta inmune.

143. (7047) AUTOANTICUERPOS CONTRA RECEPTORES MUSCARÍNICOS: SU PAPEL EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LM3 DERIVADAS DE UN ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO. CATTANEO, VALENTINA; FISZMAN,

GABRIEL ; EULALIA, DE LA TORRE ; DAVEL, LILIA; REARTE, BÁRBARA; COLOMBO, LUCAS; SACERDOTE DE LUSTIG, EUGENIA; SALES, MARIA ELENA

Area Investigación, Instituto de Oncología A. H. Roffo. Facultad de Medicina, UBA

Pacientes oncológicos poseen autoanticuerpos (autoAcs) contra proteínas sobreexpresadas. Previamente detectamos altos niveles de receptores muscarínicos (RM) funcionales en células LM3 por lo que investigamos la presencia de autoAcs en ratones BALB/c portadores tempranos del tumor LM3 (Tch) (masa tumoral en g) (0,260±0,068) y tardíos (TG) (1,354±0,330). Por Western blot evidenciamos que los sueros y la fracción IgG purificada de Tch y TG reconocen, en homogenatos de tumor y lisados de células LM3, una proteína de 70 kDa identificada por un Ac específico contra el receptor M2. La inmunomarcación se reduce por el pretratamiento de las muestras con atropina (AT). Investigamos el efecto de los sueros (2 mg prot/ml) e IgG (0,025 mg prot/ml) en ensayos de proliferación de células LM3 por incorporación de [(3)H]-timidina. El suero obtenido de Tch estimula la proliferación (163,6±5,5%; n=6), efecto que se reduce con AT 10(-6) M (99,1±8,5%). La fracción IgG de Tch también estimuló la proliferación (165,4±5,9%) que se redujo con AT (64,4±13,8; n=6). Por otra parte el suero de TG no modificó significativamente la proliferación (-12±4,5%; n=3) y el agregado de AT aumentó la incorporación de [(3)H]-timidina (93,6±3,9%; n=3). La fracción IgG de TG inhibió significativamente la proliferación de LM3 (-37,3±8,6 %; n=6) y en presencia de AT se observó un efecto estimulante (46,7± 6,6; n=3). El tratamiento con suero normal (SN) también estimuló la proliferación de células LM3 (45,8±2,33%) y el efecto disminuyó en presencia de AT (25,1±7,3). La IgG purificada de SN estimuló la proliferación (63,2±19,4%; n=6). La AT no modificó significativamente dicho efecto (41,8±5,3%; n=3). Los portadores del tumor LM3 poseen autoAcs contra RM con distinta actividad según el tiempo de evolución, mientras que estos Acs estimulan el crecimiento tumoral en Tch, existiría una fracción sérica inhibitoria en TG.

144. (7964) MECANISMOS MOLECULARES DESARROLLADOS EN RESPUESTA A IRRADIACIÓN UVB. ESTUDIO DE UNA LÍNEA DE QUERATINOCITOS HUMANOS. PAZ, MARIELA; GONZÁLEZ MAGLIO, DANIEL ; BUSTAMANTE, JUANITA (1); LEONI, JULIANA

Cátedra de Inmunología (Facultad de Farmacia y Bioquímica / UBA) - IDEHU (CONICET). (1) Cátedra de Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

La radiación solar es esencial para la vida, sin embargo está relacionada con diferentes patologías. La sobreexposición a la radiación ultravioleta B (UVB) puede desencadenar tanto daño agudo como crónico, ejerciendo efectos a distintos niveles. La piel es el órgano más expuesto a los rayos UVB y éstos afectan principalmente a los queratinocitos, generando diversas alteraciones. Dichas células son más resistentes que otras a la muerte celular por apoptosis inducida por luz UVB, requiriéndose mayores dosis para inducir este fenómeno. Dentro de los posibles mecanismos involucrados en esta resistencia se postulan la producción de óxido nítrico (NO) y la presencia de la ribonucleoproteína Ro/SS-A 60 kDa (Ro 60). En el presente trabajo se evaluó el grado de apoptosis (tinción con anexina V y yoduro de propidio por FACS) producido por irradiación de una línea de queratinocitos humanos (HaCaT) con luz UVB (50 mJ/cm²). Se estudió, por WB, su relación con la expresión de proteínas implicadas tanto en el proceso apoptótico (p53 y Bax) como en la respuesta protectora (Ro 60 y las NO sintasas -NOS-). Todos los estudios se realizaron a 0, 6, 12 y 24 horas luego de la irradiación. Los resultados indican que la dosis de radiación utilizada produce daños importantes en las células que conducen a la apoptosis, la cual se incrementa en función del tiempo (18% control; 55% 24 hs). Dichos valores se correlacionan con el aumento en la expresión de la proteína p53 (85% a las 24 hs con respecto al control) y con las variaciones en los nive-

les de Bax, la cual disminuye hasta un 44% del valor del control (6hs) que luego aumenta a un 63% (24 hs). Las NOS se evalúan como medida indirecta de la producción del NO observándose un aumento de las mismas. La expresión de la proteína Ro 60 mostró un aumento del 171% a las 24 hs con respecto al control. Estos resultados concuerdan con el rol protector que ha sido propuesto para NO y Ro 60, aunque es necesario profundizar el estudio para afirmarlo.

145. (7983) INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR SUPERANTÍGENOS EN LINFOMAS T MURINOS. MUNDIÑANO , JULIANA(1); BERGUER , PAULA(2); LIOY, VIRGINIA(1); FERNÁNDEZ , MARISA(3); DE MARZI , MAURICIO (3); GANEM , MARÍA(3); MALCHIODI , EMILIO(3); NEPOMNASCHY , IRENE(1); PIAZZON , ISABEL(1)

(1)ILEX, IHEMA, Acad. Nac. de Med. (2)Lab. Inmunol. Estructural y Molecular, Fund. Inst. Leloir. (3)IDEHU, FF y B, UBA

Los superantígenos (Sag) inducen la proliferación y apoptosis de linfocitos T que poseen determinadas cadenas Vβ específicas del receptor T. La principal vía involucrada en la apoptosis en los linfocitos T normales es mediada por la interacción Fas-FasL. Hemos observado que diferentes Sags como el Sag bacteriano SEB y Sags codificados por los Virus del Tumor Mamario Murino son capaces de inducir específicamente la apoptosis in vitro de linfomas T murinos y su administración iv. aumenta la sobrevivencia de ratones portadores de estos linfomas. Demostramos que un linfoma T Vβ5+ que aun desarrollándose en presencia de un Sag retroviral endógeno capaz de interaccionar con la cadena Vβ5+ es sensible al Sag bacteriano SEI específico para dicho Vβ. Para investigar el mecanismo por el cual los linfomas T entran en apoptosis comenzamos utilizando un linfoma T Vβ8+ co-cultivado con macrófagos singeneicos en presencia o ausencia de SEB, Sag que interacciona específicamente con esta cadena Vβ. Los niveles de apoptosis de este linfoma fueron significativamente mayores en las células tratadas con SEB (p<0.05). Se investigó la expresión de mediadores de la apoptosis. Por RT-PCR se vio aumentada la expresión de Fas y FasL, pero no la de bax, bcl-2 o bag. Por citometría de flujo se observó un aumento de Fas (media de intensidad ±DS: PBS 14.3±2 (n=3) vs. SEB 28,8±7(n=3), p<0.05) y de FasL (media del %fasL+ ±DS: PBS 6,9±1(n=3) vs. SEB 20,2±2,7(n=3), p<0.05). No se encontraron diferencias en la expresión TNFR1 o TRAIL. Resultados similares fueron observados en otros linfomas. Los resultados obtenidos muestran que los Sags son capaces de inducir la apoptosis en linfomas Ty sugieren que-al igual que en linfocitos T normales-la interacción Fas-FasL estaría involucrada en dicho fenómeno.

146. (8044) EFECTOS DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA B EN PIEL DE RATONES HAIRLESS. DAÑO AGUDO Y POSTERIOR RECUPERACIÓN DE LA EPIDERMIS. GONZALEZ MAGLIO, DANIEL; PAZ, MARIELA; FERRARI, ALEJANDRO; WEILL, FEDERICO; BUSTAMANTE, JUANITA (1); LEONI, JULIANA

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. (1) Cátedra de Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

La radiación UVB representa el 4% de las radiaciones solares y su efecto nocivo, tanto sobre células en cultivo como sobre tejidos, ha sido extensamente estudiado. Dentro de las células produce daños a distintos niveles, como estrés genotóxico y producción de radicales libres. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los cambios histológicos que se producen en la piel de ratones Hairless, entre 2 y 72 horas luego de la irradiación (200 mJ/cm²). Se estudió la relación de los cambios histológicos con los niveles de lipoperoxidación (LPO) y la expresión de las enzimas iNOS y COX-2. Los resultados muestran el deterioro de la piel luego de la exposición a la luz UVB, con acumulación de

células apoptóticas y pérdida de la arquitectura de la epidermis. Estas características se incrementan con el tiempo, siendo máximas a las 48 horas. El cambio es abrupto 72 horas post-UVB, donde se observa una marcada proliferación del tejido, con desamación de células apoptóticas. Contrariamente a lo esperado, la LPO se ve disminuida en función del tiempo, siendo mínimo a las 72 horas (30%). Paralelamente se observa un incremento de iNOS y COX-2, máximos a las 72 horas (33,7 y 13,3). Ambas enzimas muestran una disminución a las 48 horas (iNOS 13,5 y COX-2 5,3) con respecto a la muestra de 24 horas (iNOS 19,1 y COX-2 7,6). Los resultados de iNOS y COX-2 están expresados como incremento respecto al control. El daño que sufre la epidermis de ratones irradiados se correlaciona con la expresión de iNOS y COX-2. Ambas enzimas se ven disminuidas a las 48 horas, probablemente debido al gran daño producido. Es curiosa la disminución de la LPO, sin embargo este hecho se ha reportado relacionado al aumento de NO. Cabe destacar que 72 horas luego de la irradiación el tejido se encuentra en franca recuperación, evidenciándose a través de la gran proliferación y el un gran incremento en las enzimas mencionadas, demostrando un probable rol protector o regenerador.

147. (8046) GALECTINA-1 SENSIBILIZA LINFOCITOS T HUMANOS EN REPOSO A LA MUERTE CELULAR MEDIADA POR FAS (CD95): MECANISMOS SUBCELULARES INVOLUCRADOS. MATARRESEN, P; BIANCO, G; TINARI, A; MORMONE, E; MALORNI, W; RABINOVICH, G

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UBA. Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

Recientemente demostramos la capacidad de galectina-1 (Gal-1) de inducir apoptosis de linfocitos T (LT) activados. El objetivo del presente trabajo fue investigar la potencial asociación entre Gal-1 y la apoptosis de LT mediada por Fas/FasL y explorar los mecanismos involucrados. A tal fin LT purificados de sangre periférica (en reposo y activados con IL-2/PHA) fueron tratados con distintas concentraciones de Gal-1 por diferentes períodos de tiempo en presencia y ausencia de IgM anti-Fas. Se observó un incremento en los niveles de apoptosis en aquellos LT en reposo o activados sometidos a la acción del anticuerpo anti-Fas en presencia de Gal-1 (61% vs 44% LT activados; 37% vs 4% LT en reposo). Este incremento fue dosis-dependiente cuando se añadieron al cultivo concentraciones de Gal-1 entre 20 y 100 µg/ml. A los fines de determinar los eventos intracelulares implicados, se analizó el potencial de membrana mitocondrial en presencia de Fas luego de 72hs de exposición a Gal-1, encontrándose un incremento del mismo ($p < 0.01$) en forma tiempo-dependiente que muestra una hiperpolarización temprana seguida de una despolarización tardía. Un análisis paralelo de activación de caspasas demostró que el tratamiento con Gal-1 induce la activación de caspasa-8, 9 y 3 ($p < 0.01$). Utilizando inhibidores específicos se observó participación de la vía de ceramidas en este fenómeno. Los cambios morfológicos de la mitocondria, se analizaron por microscopía electrónica de transmisión observándose coalescencia y fisión de las mismas después de 18hs de exposición a Gal-1. Finalmente por microscopía confocal se encontró un incremento de la expresión de h-Fis (molécula asociada a fisión mitocondrial) y cambio de localización de la proteína DRP-1. El presente estudio reporta la primera asociación entre Gal-1 y la muerte celular asociada a Fas/FasL, lo cual provee una base racional para las propiedades inmu-norreguladoras de Gal-1 en modelos experimentales de inflamación crónica y cáncer.

148. (8079) BAFF (B CELL ACTIVATOR FACTOR) PROTEGE A LOS LINFOCITOS B DE LA APOPTOSIS ESPONTÁNEA PERO NO DE LA MUERTE MEDIADA POR FAS/FASL. GRUPPI, A; ACOSTA-RODRIGUEZ, E; MONTES, C; CRAXTON, A; CLARK, E

Inmunología, Fac de Cs Qcas, UNC-Department of Immunology, University of Washington.

Baff es un factor de sobrevivencia de linfocitos (Li) B producido por células dendríticas, monocitos y neutrófilos activados. El objetivo del presente trabajo fue identificar si Baff regula tanto la vía intrínseca como extrínseca (mediada por Fas/FasL) de la muerte celular programada de los LiB. Para ello, LiB purificados obtenidos de bazo de ratones C57/Bl6 fueron incubados con medio de cultivo o estimulados con anti-IgM, o anti-CD40 o LPS en presencia o ausencia de Baff (30 ng/ml) durante diferentes tiempos de cultivo. Posteriormente las células fueron incubadas con IgG de hamster anti-Fas (100 µg/ml) o IgG de hamster control durante 18 hs y el porcentaje de apoptosis fue determinado, analizando por citometría de flujo, el contenido de DNA hipodiploide luego de la tinción de las células con iodo de propidio. Observamos que Baff es capaz de proteger a los LiB de la muerte celular programada espontánea pero no de la muerte vía Fas. Analizando proteínas pro y antiapoptóticas, inducidas bajo condiciones de cultivo arriba mencionadas, observamos que en presencia de Baff hay una disminución de la expresión de caspasa 9 y 3 activas, pero la expresión de caspasa 8 activa no se modifica. La expresión de cIAP-2 y cFlip se encuentra incrementada en las células activadas y cultivadas con Baff y la expresión de Fas se incrementa particularmente en presencia de Baff cuando las células fueron estimuladas con anti-IgM o LPS. Coincidentemente, en los LiB donde los niveles de Fas están aumentados, se observa mayor porcentaje de apoptosis disparada por anti-Fas. Los datos indican que Baff no es capaz de proteger a los LiB de la muerte mediada por la vía Fas/FasL y que si bien Baff induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la vía extrínseca de la muerte celular programada como cIAP-2 y cFlip, este efecto protector es superado por una mayor expresión de Fas

149. (8081) LOS LINFOCITOS B DE ZONA MARGINAL RESPONDEN A LA ESTIMULACIÓN VÍA CD40 CON ALTA PROLIFERACIÓN CELULAR, DIFERENCIACIÓN A CÉLULA PLASMÁTICA Y PRODUCCIÓN DE IL-10. GRUPPI, A; ACOSTA-RODRIGUEZ, E; MONTES, C; MERINO, C; BERMEJO, D; CLARK, E

CIBICI. Fac. de Cs Qcas, UNC.. Department of Immunology, University of Washington

La producción de anticuerpos depende de linfocitos (Li) B maduros clasificados en: convencionales (B2), CD5+ (B1) o de zona marginal (ZM). Estas células tienen diferente fenotipo (basado en la expresión diferencial de CD21, CD24 y CD23) y localización topográfica, sugiriendo que tienen diferentes funciones efectoras. Los LiB maduros se generan a partir de precursores de médula ósea que completan su maduración en bazo, en el cual se identifican: LiB inmaduros transitorios 1 (T1) y T2 y LiB maduros B2 y de ZM. Una población de nuestro interés son los LiB de ZM cuya particularidad es no responder a señales vía BCR y que se postula actúan como primera línea de defensa frente a infecciones. En el presente trabajo observamos en la población de LiB totales, que luego de la estimulación con anti-CD40 (5 µg/ml), se produce un incremento importante en el porcentaje (%) de Li CD21^{high}CD24^{high} (T2 y de ZM) sin modificaciones en el % de LiB T1 o B2. Estos resultados fueron corroborados al cultivar las distintas subpoblaciones de LiB, obtenidas por «cell sorting», en presencia de anti-CD40. Simultáneamente se analizó la respuesta de las mismas a anti-IgM. Observamos que los LiT1 no proliferan frente a anti-IgM ni a anti-CD40, los B2 tienen bajos niveles de proliferación frente a anti-CD40 y altos frente a anti-IgM, mientras que los LiB de ZM no responden vía BCR y proliferan frente a anti-CD40 con valores 10 veces superiores al valor obtenido para los LiB2. En comparación con las otras subpoblaciones, los LiB de ZM estimulados con anti-CD40 secretan mayores niveles de IgM e IL-10, presentan alta expresión de Fas y, a pesar de expresar altos niveles de c-Flip, son muy susceptibles a la muerte vía Fas correlacionándose con alta expresión de IRF-4. Los resultados obtenidos permitieron identificar que los LiB de ZM, que no responden a señales mediadas por antígenos, proliferan y se diferencian a células plasmáticas vía CD40/CD40L.

INMUNOLOGÍA 4: NEUROINMUNOMODULACIÓN I Y FARMACOLOGÍA

- 150. (6746) LA SUPLEMENTACIÓN ORAL DE 17 β -ESTRADIOL A RATAS WISTAR MACHOS AFECTA EL DESARROLLO DE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE).** FURLAN, GABRIELA; MACCIÓ, DANIELA R.; ROTH, GERMAN A.

Dpto. de Química Biológica (CIQUIBIC-CONICET). Facultad de Ciencias Químicas. Univ. Nac. de Córdoba

La EAE es un modelo de enfermedad autoinmune demielinizante del sistema nervioso central que puede ser inducida en ratas por inyección de antígenos de mielina en adyuvante de Freund completo. Teniendo en cuenta la interrelación entre los sistemas inmune y neuroendócrino, se estudió la influencia del estradiol en la regulación del curso clínico de la EAE y la respuesta inmunológica contra la proteína básica de mielina (PBM) en ratas machos jóvenes a diferentes días post-inducción (dpi) de la enfermedad. Para ello el agua de bebida fue suplementada con 17 β -estradiol desde el día de inducción de la EAE (0 dpi) y hasta 42 dpi (grupo EAE+E). Paralelamente animales que bebieron solamente agua durante el mismo período fueron utilizados como controles (grupo EAE+A). El efecto de la administración oral del estradiol fue evidenciado por disminución del peso corporal y de las vesículas seminales. Aunque ambos grupos experimentales tuvieron una incidencia similar de la enfermedad, los análisis clínicos e histológicos demostraron una menor severidad de los síntomas característicos de la EAE en ratas EAE+E en comparación con los controles EAE+A. Si bien la respuesta humoral IgG anti-PBM a 14 y 25 dpi fue similar en ambos grupos, la respuesta inmune celular específica contra la PBM fue significativamente influenciada por la administración oral de estradiol. Animales EAE+E mostraron una menor respuesta de DTH a 11 dpi y un retraso en la inducción de la respuesta proliferativa in vitro de células mononucleares comparadas con el grupo EAE+A. Estos resultados permiten evidenciar que la suplementación oral de 17 β -estradiol altera la respuesta inmune celular específica contra la PBM, lo cual afectaría el desarrollo clínico de la EAE.

- 151. (6810) SUPRESION ORAL DE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE) INDUCIDA CON UNA MOLECULA HIBRIDA RECOMBINANTE DE SINAPSINA Y EL PROTOMERO B DE LA TOXINA LABIL AL CALOR DE ESCHERICHIA COLI.** SCERBO JAUREGUBERRY, M. JULIA; VERRA, DANIELA M.; MONFERRAN, CLARA G.; ROTH, GERMAN A.

Dpto. de Química Biológica (CIQUIBIC-CONICET). Facultad de Ciencias Químicas. Univ. Nac. de Córdoba

El protómero B de la toxina lábil al calor de Escherichia coli (LTB) es empleado para dirigir proteínas conjugadas al mismo hacia el sistema inmune de mucosa. En animales con EAE previamente hemos descrito la presencia en suero de células y anticuerpos con reactividad inmunológica cruzada entre proteína básica de mielina (PBM) y la proteína sinaptosomal sinapsina. Teniendo en cuenta dicha observación se estudió el efecto supresor sobre el desarrollo de la EAE de una proteína híbrida constituida por LTB y un péptido de sinapsina. Primeramente se realizaron las construcciones y se expresaron en E. coli los péptidos correspondientes a LTB, el dominio C de sinapsina (SinC) y SinC fusionado al extremo C-terminal de LTB (LTB-SinC). La EAE fue inducida en ratas Wistar por inyección de mielina total en adyuvante de Freund completo y los antígenos estudiados fueron suministrados por vía oral en soluciones acuosas por intubación gástrica a 4, 6 y 8 días post-inducción (dpi) activa de la enfermedad. La incidencia de la EAE en los animales tratados con LTB-SinC disminuyó al 50% con una concomitante reducción de las alteraciones histológicas. El estudio de la respuesta inmune celular específica contra la PBM y SinC mos-

tró una reacción de DTH menor a 11 dpi y disminución de la respuesta proliferativa de células mononucleares específica contra PBM y SinC a 14 dpi en los animales tratados con LTB-SinC con respecto al grupo control no tratado o tratado con LTB y SinC. Estos resultados indican que la administración oral de proteínas híbridas constituidas por antígenos sinaptosomales y LTB es capaz de modular la respuesta inmune característica de la EAE inducida con antígenos de mielina, lo cual afectaría el desarrollo clínico de la enfermedad.* Ambos primeros autores contribuyeron igualmente a la concreción de este trabajo.

- 152. (6819) EFECTOS DEL ESTÍMULO INFLAMATORIO CENTRAL SOBRE LA NEURODEGENERACIÓN EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP).** POTT GODOY, C; TARELLI, R; FERRARI, C; DEPINO, A; PITOSI, F

Lab Neuroinmunomodulación y terapia génica. Fundación Instituto Leloir

Introducción. La EP es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la pérdida progresiva de neuronas en la sustancia nigra (sn). Se encontró activación de microglia en la sn en modelos animales y pacientes con EP, pero aún su función no es clara. Es de destacar que la sn es la región del cerebro con mayor densidad de microglia y sus neuronas son susceptibles a la toxicidad mediada por microglia. Más aún, se ha descrito degeneración de neuronas dopaminérgicas mediada por inflamación in vivo e in vitro. El objetivo del trabajo es estudiar el efecto de un estímulo proinflamatorio central sobre la neurodegeneración de la vía nigroestriatal y el comportamiento motor en un modelo animal de EP. Resultados. Se inyectó lipopolisacárido bacteriano (LPS) como estímulo inflamatorio en la sn de ratas inyectadas previamente con 6hidroxidopamina (6OHDA) en el estriado. Solo los animales inyectados con LPS presentaron infiltrado inflamatorio y activación de microglia (GSA1-B4) hasta estadio 4 en la sn. Asimismo se detectó IL1 β en la sn de los animales con 6OHDA/LPS (20.47 \pm 1.88) y LPS (19.36 \pm 4.02) por ELISA. Se observó neurodegeneración en los animales con LPS, 6OHDA y 6OHDA/LPS evidenciado por el número de células tirosina hidroxilasa (TH) positivas y por la disminución en los niveles de dopamina en el estriado. Los animales con 6OHDA/LPS tuvieron una mayor disminución de células TH+ con respecto a 6OHDA que fue estadísticamente significativo (p<0.05). Se observó disminución de los pasos de ajuste y asimetría en el uso de los miembros delanteros (test del cilindro) en los animales 6OHDA/LPS y 6OHDA. Conclusiones. La inyección de LPS en la sn produce cambios histológicos definidos como presencia de infiltrado inflamatorio y desorganización de tejido nervioso. Este estímulo es suficiente para producir un mayor efecto neurodegenerativo de la 6OHDA que fue significativo. Los test comportamentales mostraron ser métodos sencillos y apropiados para evidenciar la degeneración de la vía nigroestriatal.

- 153. (6821) INTERACCIONES INMUNONEUROENDOCRINAS: ROL DE LA TESTOSTERONA EN EL DESARROLLO DE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL.** MACCIÓ, DANIELA R.; DITAMO, YANINA; ROTH, GERMAN A.

Dpto. de Química Biológica (CIQUIBIC-CONICET). Facultad de Ciencias Químicas. Univ. Nac. de Córdoba

La Encefalomiélitis autoinmune experimental (EAE) es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central mediada por células T autorreactivas contra la proteína básica de mielina (PBM). Atento a que los esteroides sexuales pueden regular una respuesta inmune, nuestro objetivo fue estudiar el rol de la testosterona en la respuesta inmune celular anti-PBM asociada a la EAE. Para ello desde 20 días antes de la inducción de la enfermedad se incorporó testosterona al agua de bebida de animales gonadalmente intactos y castrados. Los animales castrados mostraron una recuperación más lenta (6-8 días) que los animales gonadalmente intactos, los cuales exhibieron los sín-

tomas clínicas más severas a los 12-14 días post-inducción (dpi) de la EAE y se recuperaron espontáneamente en 2-4 días. La suplementación de testosterona redujo la incidencia de la EAE en ratas intactas y aceleró la recuperación de los signos clínicos en ratas castradas. La respuesta inmune celular contra la PBM fue estudiada mediante la DTH y la respuesta proliferativa in vitro de células mononucleares (CMN). Si bien a 14 dpi las CMN de ratas intactas no suplementadas con testosterona proliferaron de manera similar que las suplementadas, este último grupo presentó una respuesta DTH más baja. Mientras que a 19-21 dpi las CMN de ratas intactas no suplementadas ya no proliferaron en respuesta a PBM, las CMN de ratas castradas aún presentaron respuesta proliferativa contra el mismo antígeno. La suplementación de testosterona a ratas castradas revirtió estos resultados, evidenciándose respuestas similares de DTH y de proliferación que la de los animales intactos no suplementados. Por otro lado, la adición de testosterona pero no de colesterol a cultivos primarios de CMN suprimió la respuesta proliferativa específica contra la PBM. Estos resultados evidencian que la testosterona modula el curso clínico de la EAE a través de su interacción con CMN específicas contra la PBM, describiendo su posible mecanismo de acción en la EAE.

- 154. (6882) PRESENCIA DE ANTICUERPOS CAPACES DE INHIBIR LA REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS PATOLÓGICOS ANTI-PROTEINA BÁSICA DE MIELINA EN EL DESARROLLO DE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE).** VILCAES, A. ALEJANDRO; DEGANO, ALICIA L.; LÓPEZ, PABLO H.H.; NORES, GUSTAVO A.; ROTH, GERMAN A.

Dpto. de Química Biológica (CIQUIBIC-CONICET). Facultad de Ciencias Químicas. Univ. Nac. de Córdoba.

Es aceptado que en sueros normales existen anticuerpos que regulan la reactividad de autoanticuerpos. Al respecto estudiamos en sueros de ratas normales y con EAE la presencia de anticuerpos capaces de inhibir la reactividad de autoanticuerpos patológicos asociados a la EAE dirigidos contra la proteína básica de mielina (PBM). Los sueros de ratas con EAE que desarrollaron (cEAE) o no (ncEAE) síntomas clínicos fueron obtenidos previamente a la inmunización, en la etapa aguda de la enfermedad (12-14 días post-inducción, dpi) y cuando los animales se recuperaron totalmente de los síntomas clínicos (30 dpi). A partir de estos sueros por cromatografía de afinidad se obtuvieron inmunoglobulinas de tipo IgG que luego fueron depletadas de reactividad anti-PBM, analizándose por inmunodot su capacidad para bloquear la reactividad de anticuerpos IgG anti-PBM. Las fracciones depletadas provenientes de sueros preinmunes inhibieron la reactividad de anticuerpos IgG anti-PBM. El análisis de los sueros provenientes de animales cEAE demostró que la actividad inhibitoria disminuye con el inicio de los síntomas clínicos, retornando a su valor máximo luego de la remisión de los mismos. Los animales que nunca desarrollaron síntomas clínicos no mostraron cambios en la capacidad inhibitoria, la cual fue similar a la de los sueros de los animales preinmunes. Estos resultados indican que la presencia de anticuerpos IgG que bloquean la reactividad de anticuerpos IgG anti-PBM correlacionan con el desarrollo de los síntomas clínicos de la EAE. Atento a la existencia de idiotipos que tienen reacción cruzada entre anticuerpos y células de T que reconocen el mismo péptido de PBM, es posible que anticuerpos bloqueantes podrían ejercer su papel regulador no solamente en la respuesta humoral sino también en la respuesta celular anti-PBM.

- 155. (7426) SENSIBILIZACIÓN IN VITRO DE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL MEDIADA POR EL RECEPTOR B[1] A CININAS EN ARTERIA UMBILICAL HUMANA (AUH).** PELOROSSO, FACUNDO; BRODSKY, TAMARA; HALPERIN, ANA; PALMA, ALEJANDRO; ROTHLIN, RODOLFO

Tercer Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta contráctil mediada el receptor B[1] a cininas en AUH y su posible modificación a lo largo de lapsos variables de incubación in vitro. Se emplearon anillos de AUH en solución de Krebs a 37°C, pH 7.4 y burbujeados con carbógeno. En tiempos de incubación variables, se expuso a los tejidos a des-Arg (9)-kalidina (DAKD) 1 µM, registrándose la tensión desarrollada. En otra serie, se realizaron curvas concentración respuesta (CCR) a DAKD 1 µM luego de 5 h de incubación con cicloheximida (CHX) 70 µM y en anillos control. Durante los 30 m previos a cualquier estímulo con DAKD se expuso a los anillos a amastatina 10 µM, fosforamidón 10 µM y captopril 1 µM para inhibir la metabolización del agonista. Al final de cada experimento se sometió a los anillos a 5-HT 10 µM para obtener la respuesta contráctil máxima de cada preparado. Los resultados fueron expresados como media ± SEM. P<0.5 fue considerado como valor de significancia estadística. Luego de 15 m de incubación, DAKD 1 µM produjo un 3.1 ± 3.0% (n=4) de la respuesta máxima tisular. A los 30 y 60 m se produjeron aumentos de las respuestas inducidas por DAKD 1 µM no significativamente diferentes con respecto a la primera determinación (9.4 ± 2.6% [n=5], y 23.9 ± 7.4 % [n=7], respectivamente; P>0.05). Sin embargo, luego de 120, 180 y 300 m se observaron aumentos significativos de las respuestas máximas a DAKD con respecto a la obtenida a los 15 m (51.5 ± 14.9% [n=6], 87.7 ± 3.9% [n=6] y 97.0 ± 6.4% [n=7], respectivamente; P<0.05). El tratamiento con CHX 70 µM durante 5 h produjo una reducción significativa de la eficacia de DAKD (control: 81.7 ± 3.8%, n=5; CHX 70 µM: 3.9 ± 0.5 %, n=5; P<0.05), mientras que no modificó la respuesta máxima a 5-HT. Los resultados sugieren que, en la AUH, las respuestas inducidas por el estímulo de los receptores B[1] a cininas son objeto de un proceso de sensibilización in vitro, tiempo y síntesis proteica dependiente.

- 156. (7453) ACERCAMIENTO AL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS ESTÍMULOS PERIFÉRICOS SOBRE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.** TARELLI, R; POTT GODOY, MC; FERRARI, C; CHERTOFF, M; PITOSI, F

Fundación Instituto Leloir

La comunicación entre la periferia y el sistema nervioso central (SNC) es bidireccional y ocurre a múltiples niveles. Por otra parte, las infecciones sistémicas aceleran la progresión de enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Múltiple y la Enfermedad de Alzheimer (Perry et al., Nat Rev Neuroscience, 2003 4:103). Asimismo, se ha observado un efecto de la inflamación central sobre la neurodegeneración en sustancia nigra (sn), región afectada en la Enfermedad de Parkinson (EP) (Castaño et al., J. of Neurochemistry 1998, 70:1584). El objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos de estímulos pro-inflamatorios periféricos sobre el SNC en un modelo de EP. Ratas previamente inyectadas con 6-hidroxidopamina (6OHDA) en el estriado se inyectaron con lipopolisacárido bacteriano (LPS) (intraperitoneal - dosis consecutivas de 1, 2,5 y 5 mg/kg) o con 1.36X 10⁹ pfu de adenovirus recombinante expresando IL1β (intraqueal). Los animales se sacrificaron a los 14 y 21 días, respectivamente. Comparando los animales inyectados con 6OHDA/LPS o 6OHDA/IL1β con los controles, se evidenció activación de microglía a estadio 3 y una tendencia, no significativa, a una mayor neurodegeneración en la sn por conteo de células Tirosín hidroxilasa positivas. Asimismo, se observó asimetría en el uso de los miembros delanteros (Test del Cilindro) en los animales inyectados con 6OHDA y 6OHDA/LPS. Se detectaron efectos periféricos de la administración de AdIL1β o LPS por variación en la temperatura, alteraciones en la fórmula leucocitaria y variación del peso. Por lo tanto, se evidenció activación de microglía en sn en neurodegeneración en animales al los que se administro AdIL1β y LPS en periferia, aunque los estímulos utilizados tuvieron solo un efecto exacerbante mínimo sobre la sobrevida neuronal. Asimismo, se comprobaron efectos centrales de los estímulos periféricos en parámetros del comportamiento de la enfermedad (sickness behaviour).

157. (7540) CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS INVOLUCRADOS EN LA VASOCONSTRICCIÓN INDUCIDA POR ACh EN VENA UMBILICAL HUMANA. PUJOL LEREIS, VIRGINIA; HITA, FRANCISCO; RODRIGUEZ, M. CECILIA; GOBBI, MAURO D.; GOMEZ VERDI, MARCELA; ROTHLIN, RODOLFO P.

Tercer Cátedra de Farmacología. Facultad de Medicina. UBA.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los subtipos de receptores muscarínicos posiblemente involucrados en la respuesta contráctil a Acetilcolina (ACh) y a cloruro de 4-[N-(3-clorofenil) carbamoiloil]-2-butiniltrimetilamonio (McN-A-343) en vena umbilical humana (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 y a McN-A-343 (agonista selectivo de los receptores M[1]). Los datos se expresan como media \pm SEM. Atropina, antagonista muscarínico no selectivo (1nM, 3nM, 10nM), desplazó competitivamente la CCR a ACh (pA[2]: 9.75). Pirenzepina (antagonista selectivo de los receptores M[1], 0.17 μ M) produjo un corrimiento hacia la derecha de la CCR a ACh (pCE[50] control: 5.96 \pm 0.07; pirenzepina: 4.99 \pm 0.07, p<.05; pA[2] aparente: 7.58) sin afectar la respuesta máxima. El para-fluoro-hexahidro-sila-difenidol-hidroclorido (p-FHHSiD, antagonista selectivo de los receptores M[3], 30nM) corrió hacia la derecha la CCR a ACh (pCE[50] control: 6.14 \pm 0.06; p-FHHSiD: 5.66 \pm 0.08, p<.01; pA[2] aparente: 7.94). Metocitramina (antagonista selectivo de los receptores M[2], 1 μ M) desplazó hacia la derecha la CCR a ACh (pCE[50] control: 5.61 \pm 0.08; metocitramina: 4.96 \pm 0.14, p<.001; pA[2] aparente: 7.20) sin modificar la respuesta máxima. McN-A-343 se comportó como un agonista completo (rta. máx.: 95.23 \pm 9.45%; pEC[50] de 5.81 \pm 0.17). Estos resultados sugieren, en función de la potencia de los antagonistas, que la acción vasoconstrictora de ACh involucra la activación de receptores M[3] y M[1] en VUH. Por otra parte los valores de pEC[50] obtenidos con McN-A-343, concuerdan con otros ya publicados para receptores M[1]. En conjunto, estos resultados sustentan la presencia de una subpoblación de receptores M[3] y M[1] en vena umbilical humana.

158. (7698) METALOPEPTIDASAS EN VENA UMBILICAL HUMANA: SU INHIBICIÓN POTENCIA LA RESPUESTA CONTRÁCTIL INDUCIDA POR BRADICININA. NOWAK, WANDA; GOLDSCHMIDT, EZEQUIEL DARIO; PUGLIESE, MARIANA INES; FALCIONI, ALEJANDRA GEORGINA; ROTHLIN, RODOLFO PEDRO

3ª Cátedra 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, con el uso de inhibidores y empleando estudios funcionales, si las enzimas convertidora de angiotensina (ECA) y endopeptidasa neutra (NEP) participan en la inactivación biológica de la bradicinina (BK) en vena umbilical humana (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) a BK (agonista selectivo para el receptor a cininas B[2]) y FR 190997 (agonista selectivo para el receptor a cininas B[2] resistente a la degradación por metalopeptidasas) en ausencia y presencia, 30 min antes de la CCR, de diferentes inhibidores enzimáticos. Resultados: La aplicación previa de Captopril 1 μ M (C, inhibidor selectivo de la ECA) o de Fosforamidón 10 μ M (F, inhibidor selectivo de la NEP) indujo un corrimiento hacia la izquierda de la CCR a BK (pCE[50] control: 10.01 \pm 0.05; C: 10.54 \pm 0.09; F: 10.55 \pm 0.06, p<.0001, ANOVA). La exposición concomitante a Captopril 1 μ M y Fosforamidón 10 μ M indujo una mayor potenciación de la respuesta a BK en comparación con la

obtenida con la aplicación individual de los inhibidores mencionados (pCE[50] C: 10.54 \pm 0.09; F: 10.55 \pm 0.06, C+F: 10.91 \pm 0.07 p<.05, ANOVA). La aplicación conjunta de Captopril 1 μ M y Fosforamidón 10 μ M no modificó la respuesta a FR190997. Conclusiones: Estos resultados constituyen una sólida evidencia que en VUH las metalopeptidasas participan en la inactivación biológica del agonista endógeno BK, posiblemente reduciendo su concentración efectiva en biofase.

NEUROCIENCIAS 1: CLÍNICA Y PATOLOGÍA 1 - NEUROQUÍMICA Y NEUROFISIOLOGÍA 1

159. (6646) INFLUENCIA DE LA EDAD Y DEL SEXO EN MEDIDAS ANTEROPOSTERIORES DEL CEREBRO EN IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA. MERLO, ALICIA ; ALBANESE, ALFONSO M; GÓMEZ, ELENA; MIÑO, JORGE; CANCELA, MARCIAL; INGRATTA, ADRIANA; ALBANESE, EDUARDO

Facultad de Medicina. Universidad del Salvador. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Hospital Francés.

La bibliografía muestra influencias de edad y sexo sobre volúmenes cerebrales pero son escasos los estudios que a tal efecto utilizan parámetros unidimensionales. Objetivo: Determinar en imágenes parasagitales de resonancia magnética (IPRM) posibles variaciones unidimensionales anteroposteriores en función de la edad y del sexo. En IPRM de 35 sujetos masculinos y 64 femeninos (edad 17-84 años) se midió (Scion Image for Windows) la longitud del segmento H, que pasa por los puntos más distantes del borde ventral del cuerpo caloso (cc) y termina en los bordes del cerebro. Se calculó la correlación de Pearson (r) entre la edad y el aporte porcentual de sus partes: anterior (entre el borde dorsal del cc y el borde anterior de la imagen del cerebro), media (entre ambas intersecciones con el borde dorsal del cc) y posterior (porción restante). Los valores de H (cm) izquierda y derecha (media \pm ES) son: entre 17-40 años en el hombre 16.34 \pm 0.16 y 15.98 \pm 0.14 y en la mujer 15.58 \pm 0.14 y 15.40 \pm 0.13; entre los 41-60 años en el hombre 16.49 \pm 0.23 y 16.31 \pm 0.20 y en la mujer 15.62 \pm 0.13 y 15.45 \pm 0.14 y entre los 61-84 años en el hombre 15.73 \pm 0.27 y 15.56 \pm 0.20 y en la mujer 15.37 \pm 0.13 y 15.26 \pm 0.12. En el hombre, H es mayor que en la mujer entre 17-60 años (p<0.01, ANOVA) y no entre 61-84 años. Las r entre edad y % de longitud izquierda y derecha anterior son para el grupo masculino -0.50 (p<0.01) y -0.65 (p<0.01) y para el femenino -0.66 (p<0.01) y -0.73 (p<0.01) respectivamente. Entre edad y % de la parte media las r, izquierda y derecha, son para el grupo masculino 0.39 (p<0.05) y 0.49 (p< 0.01) y para el grupo femenino 0.47 (p<0.01) y 0.57 (p<0.01). El % posterior no correlaciona con la edad. Mediante un estudio que utiliza parámetros unidimensionales se evidencian variaciones del cerebro con la edad y el sexo compatibles con resultados obtenidos en la bibliografía mediante estudios que miden cambios de volúmenes.

160. (6700) ESTUDIO TEMPORAL DE LA TRANSMISIÓN NORADRENÉRGICA EN EL HIPOTÁLAMO ANTERIOR (HA) Y POSTERIOR (HP) DE RATAS HIPERTENSAS DOCA-SAL. DI NUNZIO, ANDREA ; HOPE, SANDRA; MORGAZZO, CAROLINA; DATTILO, MELINA; BIANCIOTTI, LILIANA (1); VATTA, MARCELO

Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (1) Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

No existe un estudio de las alteraciones de la transmisión noradrenérgica hipotalámica durante el desarrollo del modelo de hipertensión DOCA-sal. El objetivo del presente trabajo fue estudiar, en diferentes tiempos del desarrollo de la hipertensión DOCA-sal, la captación y la liberación neuronal de noradrenalina (NA) (Vatta y col., Regul. Pept.,65, 175,1996) en el HA y HP de ratas. Los datos se expresan como % vs control (ANOVA y «t»

test mod. por Bonferroni; * $p < 0.05$). En la primer semana (presión (P) mmHg: control, 133 ± 3.5 ; DOCA, 130 ± 1.3), tanto la captación como la liberación de NA disminuyeron, en el HA derecho (HAD) (48%* y 35%* respectivamente) e izquierdo (HAI) (25%* y 37%* respectivamente) y en el HP derecho (HPD) (27%* y 29%* respectivamente) e izquierdo (HPI) (33%* y 32%* respectivamente). En la tercer semana (P mmHg: control, 127 ± 7 ; DOCA, 139 ± 5), la captación y la liberación disminuyeron tanto en el HAD (38%* y 43%* respectivamente) como en el HPD (20%* y 25%* respectivamente). Tanto en el HPD como en el HPI, la liberación de NA aumentó (39%* y 30%* respectivamente), mientras que la captación disminuyó (53%* y 40%* respectivamente). En la quinta semana (P mmHg: control, 122 ± 4 ; DOCA, 156 ± 3.5), en el HAD la captación de NA aumentó (40%*), mientras que la liberación disminuyó (20%*). En el HAI no se observaron modificaciones. En el HPD y HPI, aumentaron tanto la liberación de NA (32%* y 27%* respectivamente) como la captación (26%* y 37%* respectivamente). Los resultados sugieren la existencia de un desbalance de la transmisión noradrenérgica hipotalámica en el modelo de hipertensión DOCA-sal, la cual comienza a expresarse antes del establecimiento de la hipertensión.

161. (6791) ACTIVACION DIFERENCIAL DEL NÚCLEO DEL TRACTO SOLITARIO (NTS) EN ANIMALES DEFICIENTES EN β -ENDORFINAS (β -END) SOMETIDOS A UNA SOBRECARGA DIETARIA DE SODIO (SDS). CAEIRO, X¹; GARCÍA, N²; RUBINSTEIN, M³; VIVAS, L¹

Instituto Mercedes y Martín Ferreyra ¹ Instituto Mercedes y Martín Ferreyra ² IPEM ³INGEBI, CONICET- Universidad de Buenos Aires,

En animales con capacidades normales de regulación del balance hidrosalino, la SDS desencadena mecanismos tendientes a mantener niveles normales de tensión arterial (TA), entre los que se ha reportado un aumento en los niveles del ARNm de POMC. Sin embargo, en las cepas de ratas sensibles a la sal y en las espontáneamente hipertensas (SHR) ante una SDS se observa una producción deficiente de β -End y de su precursor POMC, lo cual se asocia a un aumento en la TA. El núcleo arcuato, uno de los principales sitios de síntesis de POMC, proyecta a áreas del cerebro involucradas en la regulación cardiovascular como el NTS. En la cepa de ratas SHR mantenidas con una SDS, se observa un aumento en la TA la cual se correlaciona con un aumento en la actividad neuronal del NTS caudal. El objetivo del presente trabajo fue analizar la participación del sistema β -endorfinérgico en la modulación de la TA y actividad neural cerebral en un modelo de SDS. Para ello se empleó una cepa de ratones «knockout» (KO) que presenta una deficiencia selectiva para el gen de β -End. Animales de los tres genotipos, salvajes (WT), KO y heterocigotas (HT) para la mutación, fueron mantenidos durante 2 semanas con una SDS. Posteriormente se registró la TA y dos días después fueron perfundidos y sus cerebros procesados para analizar el patrón de inmunoreactividad a Fos (Ir-Fos) en áreas involucradas con el control de la TA. Los resultados indican que los ratones con ausencia o deficiencia en β -End con SDS, presentan un aumento en la TA, mientras que en los WT sujetos al mismo tratamiento, no se observan cambios significativos. Por otra parte, en ratones KO mantenidos con una SDS se observa un aumento en la Ir-Fos a nivel del NTS en comparación a lo observado en animales WT. Nuestras evidencias sugieren la participación de las β -End en el mantenimiento de la TA normal en situaciones de SDS posiblemente a través de la modulación de la actividad del NTS. Sub. CONICET, ANPCyT

162. (6800) ACTIVACIÓN (FOS) DE LA AMIGDALA EXTENDIDA MEDIAL ASOCIADA A LA PERCEPCION FEROMONAL. PARTICIPACIÓN DE NEURONAS GABA POSITIVAS. PERENO, GERMAN LEANDRO; ORTIZ, CELILIA; BELTRAMINO, CARLOS

INIMEC-CONICET y Cátedra de Neurofisiología y Psicofisiología- Facultad de Psicología. UNC.

La percepción de señales ambientales por los organismos vivientes se realiza por órganos sensoriales generales y específicos. Entre estos últimos se encuentra el olfato, que en su Sistema Olfatorio Accesorio, es aferente de la Amígdala Extendida Medial (AMeX) del Lóbulo Temporal, componente límbico que modula por percepción feromonal, los aspectos emocionales de la conducta social y reproductiva. Anatómicamente la AMeX está compuesta por el Núcleo Amigdalino Medial, Núcleo Intersticial de la Estría Terminal, Núcleo del Tracto Olfatorio Accesorio y Núcleo Posteromedial Cortical. Se estudió si la actividad neuronal luego de la percepción olfatoria feromonal detectable por la proteína Fos, activa neuronas de la AMeX, y si dichas neuronas expresan GABA. El Gaba es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia en el SNC. Metodología: ratas hembras wistar fueron expuestas al olor feromonal del macho por 2 horas, mientras que los animales controles no percibieron feromonas. Sus cerebros se fijaron para procesarlo para doble inmunohimiquímica (negro para C-Fos (nuclear) y marrón para GABA (citoplasma y prolongaciones) con el método de doble anticuerpo y complejo ABC. Se observaron los cortes en microscopio Axioplan con cámara captadora de imágenes acoplada a una PC con programa estadístico. Se utilizó el Test de Student con una $p < 0.05$ como limite de significación. Conclusiones: neuronas inmunoreactivas para Gaba (citoplasma) y fos (nuclear) fueron halladas en la AMeX, estableciendo diferencias entre controles y experimentales, siendo esta doble marca significativamente mayor ($p < 0.05$) en los últimos. Esto sugiere que las neuronas que contienen Gaba en la AMeX, participan en el procesamiento de la información feromonal concerniente a la conducta reproductiva y establecen un filtro inhibitorio de esta información sensorial feromonal muy importante en la fisiología de esta especie.

163. (6802) DIFERENCIAS SEXUALES EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR DEL ESTRÓGENO POR INYECCIÓN DE ACIDO KAINICO EN LA AMIGDALA EXTENDIDA MEDIAL. PERENO, GERMAN; BELTRAMINO, CARLOS

INIMEC-CONICET y Cátedra de Neurofisiología y Psicofisiología- Facultad de Psicología, UNC.

En estudios previos hemos demostrado en ratas machos y hembras la lesión de la Amígdala Extendida Medial (AMeX) por efecto de Ácido Kainico (AK), fármaco mimético del Glutamato utilizado como modelo experimental de epilepsia. En modelos animales de neurodegeneración se ha sugerido un efecto neuroprotector del estrógeno sobre el SNC. Nuestro objetivo es mostrar evidencias de este efecto en el Núcleo Amigdalino Medial (AMe) luego de la inyección de AK en ratas hembras y machos en diferentes condiciones endocrinas. Metodología: se usaron ratas hembras ovariectomizadas (OVX) y con estrógeno (OVX+E) y machos castrados y castrados + estrógeno. Los grupos experimentales se inyectaron IP con 8 mg/kg de AK, produciendo un Estado Epiléptico (grado 4 según escala de Tuunanen y col, 1999). Los animales controles se inyectaron con salina. Todos los grupos se sacrificaron a las 24 horas mediante anestesia con Hidrato de Cloral 30% IP, fijándose el cerebro con paraformaldehído 4%. Los cerebros se seccionaron en micrótomos de congelación y se tiñeron con la técnica Amino-Cupro-Argéntica para muerte neuronal. Se observaron los cortes en microscopio Axioplan con cámara captadora de imágenes acoplada a una PC con programa estadístico. Se utilizó el Test de Student con una $p < 0.05$ como limite de significación. Conclusiones: al comparar OVX vs CDO se observó mayor muerte neuronal en estos últimos. Comparando OVX+E vs CDO+E se observa un claro efecto neuroprotector del Estrógeno. Sin embargo, el mismo fue significativamente menos efectivo en proteger la AMeX del efecto de AK en los machos. Esto sugiere una mayor vulnerabilidad de la AMeX en machos al AK y un menor efecto protector del estrógeno en los mismos.

164. (6827) ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LAS CONVULSIONES EN RATAS SOMETIDAS A ASFIXIA PERINATAL. EFECTO DE HIPOTERMIA. GIRARDI, ELE-

NA; GONZÁLEZ, NÉLIDA N; CANITROT, JUAN; LÓPEZ, ESTER M; COIRINI, HÉCTOR (1); LOIDL, CÉSAR F

Instituto de Biología Celular y Neurociencia Prof E De Robertis. Fac de Medicina. UBA. 1-IByME y Dpto de Bioquímica Humana. Fac de Medicina.UBA

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la asfixia perinatal (AP) por inmersión transitoria (19/20min) en agua a 37°C, produce en el cerebro una marcada reacción astrogliar que no es observada cuando la AP se produce a 15°C (HIP). En otro tipo de estudios observamos respuesta astrocitaria con la administración del convulsivante ácido 3-mercaptopropiónico (MP) a ratas normales. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración de MP en ratas adultas sometidas a AP e HIP, analizando su comportamiento y la respuesta astrocitaria en hipocampo y cerebelo. Se utilizaron ratas Sprague Dawley (45días) macho controles (CTL) y sometidas a AP o HIP a los que se les administró, diariamente durante 4 días MP (45mg/kg i.p.). Los cerebros fueron procesados para estudios inmunohistoquímicos usando anticuerpo anti-GFAP y la técnica de peroxidasa-antiperoxidasa, realizándose un análisis de imágenes computarizado. Las ratas CTL y AP, luego de la administración de MP, no mostraron diferencias en el tiempo de inicio de las convulsiones, (5 a 10 min después de la inyección), aunque en el grupo AP, un 10% de los animales entró en status epilépticos. Por otro lado la duración de las convulsiones se vio reducida en un 70% en las ratas HIP. Los estudios de inmunomarcación con GFAP en la región CA1 del hipocampo mostraron un incremento en el área astrocitaria del 40-60% en AP y del 30% en HIP, mientras que en el hipocampo se observó un aumento de 20% en AP y de 40% en HIP. En el área astrocitaria de la capa granular del cerebelo se observó un incremento del 50% en AP. Estos resultados muestran que las ratas sometidas a AP presentan un comportamiento similar al tratamiento con el convulsivante MP, pero las ratas HIP tienen convulsiones con menor tiempo de duración con una reacción astrogliar que se manifiesta con intensidad variable dependiendo del área cerebral, lo cual indica diferentes compromisos según el área. (UBACYT-M020-M033-CONICET)

165. (7046) ANTICUERPOS ANTI-GM1 EN UN MODELO ANIMAL DEL SÍNDROME DE GUILLAIN BARRE. MOYANO, ANA L; COMIN, ROMINA; ALANIZ, MARIA E ; LARDONE, RICARDO D; NORES, GUSTAVO A

Departamento de Química Biológica y CIQUIBIC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Córdoba.

Existen numerosas evidencias que muestran una asociación entre anticuerpos anti-GM1 y neuropatías motoras humanas. Recientemente se desarrolló un modelo experimental de SGB en conejos, producido por inmunización con el gangliósido GM1 (Yuki y col. Ann Neurol, 49, 712, 2001). En el presente trabajo se caracterizó la respuesta inmune humoral obtenida durante la evolución de este modelo de enfermedad. Seis conejos fueron inmunizados usando CFA como adjuvante: un par de ellos recibió además GM1/KLH (grupo 1), otro sólo GM1 (grupo 2) y los restantes KLH (grupo 3). A partir de la primera inmunización se obtuvieron muestras semanales de suero y se realizaron mediciones del peso corporal. Entre los 62 y 75 días post-inmunización (dpi) se observó una pronunciada caída transiente en el peso de los conejos del grupo 1, coincidiendo con síntomas de debilidad en miembros posteriores. Los restantes conejos (grupo 2 y 3) presentaron una evolución normal. El análisis de la reactividad de anticuerpos IgM presente en los animales mostró la presencia de anticuerpos contra los glicolípidos GA1/GM1/GD1b. El título encontrado para anticuerpos anti-GM1 en el grupo 1 fue de 5000, mientras que los restantes grupos mostraron valores de 40-80. Aunque estos últimos, fueron similares a los valores preinmunes, los anticuerpos serían diferentes ya que mostraron un aumento de afinidad. En el grupo 1 la mayor parte de los anticuerpos fueron de alta afinidad. Anticuerpos anti-GM1 de isotipo IgG fueron encontrados en los tres grupos de cone-

jos, aunque en títulos muy diferentes. Los conejos del grupo 1 presentaron títulos de 5000, mientras que los del grupo 2 y 3 mostraron valores menores a 40. Estos resultados muestran que aunque GM1 y KLH son poco inmunogénicos por ellos mismos, su uso combinado genera la respuesta inmune suficiente para producir el desarrollo de una enfermedad autoinmune.

166. (7082) ANALISIS DE LAS MANIFESTACIONES CLINICAS ICTALES Y POSTICTALES EN PACIENTES CON ESCLEROSIS HIPOCAMPAL Y PACIENTES CON ESCLEROSIS HIPOCAMPAL PLUS. GIAGANTE, BRENDA; MELCON, CARLOS; ODDO, SILVIA; SILVA, WALTER; CONSALVO, DAMIAN; D'ALESSIO, LUCIANA; SOLIS, PATRICIA; PAPAYANIS, CRISTINA; CENTURION, ESTELA; SALGADO, PABLO; KOCHEN, SILVIA

Centro de Epilepsia, Htal Ramos Mejía. Ins.de Biología Celular y Neurociencias .UBA CONICET CEFYBO

Objetivo: Comparar las manifestaciones clínicas ictales y postictales en pacientes con esclerosis hipocampal (EH) y EH asociada a alteraciones en el polo temporal (EH Plus). Método: Revisamos los registros de video-EEG de 32 pacientes (104 crisis) con diagnóstico de EH o EH Plus. Los pacientes fueron clasificados en 2 grupos: grupo 1-EH, y grupo 2-EH-Plus. Analizamos las manifestaciones clínicas presentes durante las crisis y en el período postictal. Para el análisis estadístico utilizamos el test de Chi cuadrado o Test de Fisher según el tamaño de la muestra, y regresión logística binaria en aquellas variables con significancia estadística. Resultados: Grupo 1: 18 pacientes, 51 crisis; grupo 2: 14 pacientes, 53 crisis. Las manifestaciones significativamente más frecuentes fueron: grupo 1: desviación cefálica precoz (p=0.013), vocalización (p=0.002), lenguaje ictal comprensible (p<0.001), hiperpnea (p=0.032); y grupo 2: presencia de aura (p=0.003), desviación ocular forzada previa a una generalización (p=0.034), desviación cefálica tardía (p=0.005), versión cefálica previa a una generalización (p=0.018), desviación de la comisura labial (p=0.015), clonias unilaterales (p=0.037), parpadeo (p=0.007), frote de nariz postictal (p<0.001), e hipersalivación (p=0.031). En el análisis de regresión logística las variables que tuvieron mayor significancia estadística para clasificar los 2 grupos fueron: en el grupo 1: desviación cefálica precoz, y en el grupo 2: versión cefálica previa a una generalización, parpadeo, vocalización, y frote de nariz postictal. Estas observaciones sugieren que estarían involucradas diferentes redes neuronales durante las crisis de pacientes con EH y EH Plus.

167. (7195) ESTUDIO DE UN MODELO MURINO DE ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE): CARACTERISTICAS CLINICAS Y NEUROPATOLÓGICAS. GARAY, LAURA; GONZÁLEZ DENISELLE, MARÍA C.; LIMA, ANALÍA; ROIG, PAULINA; DE NICOLA, ALEJANDRO F.

IByME y Depto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

La EAE es una enfermedad autoinmune desmielinizante y modelo experimental de Esclerosis Múltiple. EAE se indujo en ratones C57/BL6 hembras por inmunización con la glicoproteína oligodendrocitaria de mielina (MOG) (péptido 40-54) emulsionada en Adyuvante de Freund Completo y posterior inyección de toxina Pertussis. Los animales desarrollan la enfermedad a partir del día 12 post-inyección. Los grados clínicos se clasifican en: I-inicial, II-III: moderado y IV-severo. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el modelo a nivel de la médula espinal (sustancias gris y blanca) analizando los siguientes parámetros: 1-Reactividad astrogliar, mediante inmunocitoquímica de la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP); 2-Área de infiltración celular por tinción con Hematoxilina-Eosina y 3- % de desmielinización a través de la tinción Luxol Fast Blue, cuantificando (1),(2) y (3) con un analizador de imágenes computarizado. Se observó en los animales EAE vs controles (CTRL): 1-Un incremento 7X del n° de astrocitos

inmunoreactivos/mm² en la sustancia gris (EAE: 152.7 ± 17.39 vs CTRL 20.95 ± 8.37 ; $p=0.0015$), encontrándose una mayor densidad de células GFAP+ a medida que empeoran los signos clínicos ($r=0.979$ $p<0.005$). 2-Área de infiltrado mononuclear en sustancia blanca, Grado I: 462.4 ± 47 μm^2 , ($p<0.05$ vs II-III; $p<0.001$ vs IV); grado II-III: 8805 ± 2681 y IV: 24910 ± 3581 , ($p<0.001$ vs II-III). Existió una correlación positiva entre el área de infiltración y el grado de severidad clínica ($r=0.97$, $p=0.028$). 3-La presencia de focos de desmielinización en sustancia blanca, donde el % de desmielinización en EAE correlacionó positivamente con el área de infiltración ($r=0.99$, $p=0.0019$). Conclusiones: Las alteraciones neuropatológicas encontradas semejan a la Esclerosis Múltiple Humana. Por lo tanto, este modelo inducido por MOG (40-54) podría ser de utilidad para el desarrollo de nuevas terapéuticas que promuevan la mielinización.

168. (7280) MARCADORES PERIFÉRICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS NEUROLÓGICAS. REPETTO, MARISA; LLESUY, SUSANA

Cátedra de Química General e Inorgánica. (PRALIB-CONICET) Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.

El estrés oxidativo (EO) está asociado a las enfermedades neurológicas y en el deterioro cognitivo de los pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD), demencia vascular (DV) y Parkinson (PD). La evolución clínica de estos pacientes se estudia mediante pruebas psicológicas. El estudio de los marcadores periféricos de estrés oxidativo (MPEO) brindaría un criterio adicional para seguir la evolución de los pacientes y los efectos colaterales de los tratamientos farmacológicos. El objetivo de este trabajo fue determinar si los MPEO en sangre y plasma de pacientes con neuropatías reflejan el estado neuronal a nivel sistémico. Para ello se evaluaron la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), como también la quimioluminiscencia iniciada por hidroperóxido de ter-butilo (QI), capacidad antioxidante del plasma (TRAP) y el contenido de glutatión total (GSH) en eritrocitos. Se evaluaron 18 pacientes con AD 15 con VD, y 18 individuos sanos de 75 ± 3 años, como controles. El grado de deterioro cognitivo fue evaluado por el Mini Mental State Examination y el Global Deterioration Scale. En PD fueron divididos en 2 grupos y se clasificaron según la escala Hoehn y Yahr: grupo 1 formado por 12 pacientes (grado clínico I-II), y grupo 2 por 9 pacientes (III-IV) que recibieron L-dopa (918 ± 7 mg/día). Los controles fueron 10 sujetos sanos de 58 ± 2 años. Se observó una disminución del TRAP del 24% en AD ($p<0,05$) y del 30% en PD tratados con L-dopa ($p<0,001$). En AD y VD se observó un aumento del 52 y 50% en QI ($p<0,001$) respectivamente y del 100% en PD tratados con L-dopa ($p<0,001$). Se observó una clara correlación entre TRAP y QI con respecto al grado de deterioro cognitivo en AD y PD. GSH disminuyó un 40% en AD, VD y PD. L-dopa en PD aumentó el EO. La actividad de SOD y CAT mostró un perfil diferente en cada patología. Una situación de EO periférico se manifestó en estas patologías. MPEO reflejan las condiciones neuronales en sangre y plasma, correlacionando con el daño cognitivo, EO y la evolución de los desórdenes neurológicos.

169. (7744) CAMBIOS PLÁSTICOS INDUCIDOS POR LUZ Y OSCURIDAD EN CÉLULAS AMACRINAS SEROTONINÉRGICAS DE RETINA. FOSSER, NICOLÁS S. (1); VARELA, MYRIAM E. (1); RÍOS, HUGO (1,2)

Inst. Biol. Cel. y Neurociencias «Prof. E. De Robertis», Facultad de Medicina, UBA. Paraguay 2155. (1) Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, UBA (2).

El circuito neuronal responsable de la eferencia principal de la retina se halla organizado en un sistema columnar formado por los fotorreceptores, células bipolares y ganglionares. Pero la capacidad de la retina como órgano receptor también depende de la integración de la información visual, integración en la que

participan otras neuronas que forman los circuitos locales de la retina. En nuestro laboratorio describimos la organización espacial y estructura de la población de células amacrinas serotoninérgicas (5-HT) y la organización de los plexos que forman estas células en la capa plexiforme interna (CPI) de la retina del pollo. También describimos la particular disposición de estos plexos; uno en la subcapa 1 de la CPI [sublámina a en mamíferos y que está relacionada con la vía off-center] y el otro plexo distribuido en la subcapa 4, [sublámina b en las retinas de mamíferos y relacionada con la vía on-center]. Nuestro objetivo en este trabajo es demostrar que la luz o la oscuridad modelan la organización estructural de las neuronas retinianas. En este trabajo utilizamos tres grupos experimentales con diferentes estímulos luminosos: luz blanca continua, un ciclo de luz roja/oscuridad y un ciclo de luz blanca/oscuridad durante el desarrollo postnatal temprano del pollo: días 3, 6, 9 y 12. Las retinas de estos animales se disecaron y se procesaron mediante la técnica inmunohistoquímica para detectar serotonina. Las retinas se fotografiaron, digitalizaron las imágenes y se realizó el análisis morfométrico de los plexos neuronales 5-HT. Los resultados de este trabajo muestran que la luminosidad del medio -luz u oscuridad- induce modificaciones morfológicas en las neuronas 5-HT de la retina del pollo; específicamente a nivel de sus plexos presentes en la CPI. Estas condiciones experimentales modifican el patrón neurítico -organización espacial- de las neuronas amacrinas serotoninérgicas, y estas a su vez modularían los circuitos on-off de la vía. PEI6469 - UBACyT O007

170. (7879) ALLOPREGNANOLONA MODULA NEGATIVAMENTE EL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO/NMDA HIPOTALÁMICO INHIBIENDO LA LIBERACIÓN DE LH. FARRE, E; CELEDON, V; GONZALEZ, J; CABRERA, R

LINCE-IMBECU-CONICET-FCM-UNCuyo

Allopregnanolona (ALL) modula receptores ligados a canales iónicos como GABA A y NMDA. Previamente demostramos que ALL tiene un efecto inhibitorio no genómico sobre la liberación de LH, modulando el sistema GABAérgico a través de su receptor GABA A. El objetivo de este trabajo fue estudiar la acción de ALL administrada intracerebroventricular (icv) sobre la liberación de LH inducida por el sistema glutamatérgico/NMDA. Se utilizaron ratas hembra ovariectomizadas impregnadas con estrógeno ($25 \mu\text{g}/\text{rata sc}$) y progesterona ($1\text{mg}/\text{rata}$) ($n=7-9$). En el día del experimento se implantó un catéter en la vena yugular para la extracción seriada de sangre. A las 16 hs se tomó una muestra basal y luego de 30 minutos se administró ALL (icv) 120 nM o las diferentes drogas a estudiar. A las 17 hs se comenzó a coleccionar sangre cada una hora hasta las 21 hs inclusive. En otros grupos independientes se administró NMDA (10 mM) solo o combinado con ALL; AP7 (antagonista NMDA) (25 mM) solo o combinado con ALL. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM en ng/ml de LH liberada y analizados estadísticamente por ANOVA 2 y post Hoc-Test. ALL inhibió la descarga de LH inducida por NMDA a las 18, 19, 20 y 21 hs; $18(6.6 \pm 1.6 \text{ vs } 1.7 \pm 0.39)$, $19(10.9 \pm 3.5 \text{ vs } 1.9 \pm 0.41)$, $20(10.2 \pm 3.1 \text{ vs } 2.36 \pm 0.59)$, $21(9.5 \pm 3 \text{ vs } 1.85 \pm 0.62)$ ($P<0.001$ respectivamente). AP7 administrado posteriormente a ALL no revirtió el efecto inhibitorio, sin embargo la administración de AP7 previo a ALL revirtió este efecto a las 19, 20 y 21hs, $19(7.0 \pm 1.3 \text{ vs } 1.9 \pm 0.4)$, $20(14.3 \pm 1.9 \text{ vs } 2.4 \pm 0.6)$, $21(22.7 \pm 3.7 \text{ vs } 1.9 \pm 0.6)$, (19 hs $P<0.01$; 20 y 21 hs $P<0.001$) sugiriendo una alta especificidad del neuroesteroide en la regulación del sistema excitatorio/NMDA. Estos resultados y los anteriores refuerzan la hipótesis de que ALL interfiere con los mecanismos (excitatorios/inhibitorios) asociados a la regulación de la secreción de LH a nivel hipotalámico; proyectando a los neuroesteroides como importantes moléculas neuroactivas asociadas a la función reproductiva en la rata hembra.

171. (7933) ENCEFALITIS ALÉRGICA EXPERIMENTAL EN RATAS LEWIS MACHO SUJETAS A RESTRICCIÓN CA-

LÓRICA. FURIO, ANALÍA; ESQUIFINO, ANA; CANO, PILAR; CUTRERA, RODOLFO; CARDINALI, DANIEL

Dto De Fisiología, Fac De Medicina, Universidad De Buenos Aires. Dto. De Bioquímica Y Biología Molecular III, Fac. De Medicina, Universidad Complutense, Madrid

Introducción. La encefalitis alérgica experimental (EAE) es un modelo animal de esclerosis múltiple. Objetivos. Analizar el efecto de la restricción calórica en el desarrollo de encefalitis alérgica experimental en ratas de la cepa Lewis. Evaluar niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona, prolactina, hormona de crecimiento y respuestas mitogénicas en ganglios linfáticos submaxilares. Métodos: Ratas macho de 6 semanas sometidas a restricción calórica del 66% o con dieta normal. A los 15 días los animales fueron inyectados con adyuvante completo de Freund emulsionado con homogenato de médula espinal (HME) o con adyuvante completo de Freund solamente. Se evaluaron diariamente los signos clínicos de EAE, siendo sacrificadas a los 15 días. Resultados: Sólo los animales con dieta normal mostraron signos clínicos de EAE. Las ratas en dieta restringida no exhibieron aumentos significativos en ACTH y corticosterona como en las ratas inmunizadas con HME, ni se detectó la correlación significativa entre los niveles circulantes de ACTH y corticosterona vista en los animales sometidos a dieta normal ($r^2=0.463$, $p<0.01$). En general la restricción calórica aumentó los niveles de ACTH y corticosterona, aumento que no fue afectado con HME. Sólo en ratas restringidas calóricamente se verificó aumento en la secreción de prolactina luego de la restricción calórica puede afectar el curso de EAE en forma significativa.

172. (7934) RESPUESTA ANORMAL DE NEURONAS DEL GLOBO PÁLIDO A AFERENCIAS CORTICALES EN EL PARKINSONISMO EXPERIMENTAL. ZOLD, CAMILA; MURER, GUSTAVO; RIQUELME, LUIS

LFCN, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA

El funcionamiento normal de los ganglios de la base (GB) requiere la segregación de información proveniente de distintas regiones corticales en canales paralelos de procesamiento en conjunto con procesos de integración entre las entradas córtico-estriatales y córtico-subtalámicas. La degeneración de la proyección nigroestriatal alteraría aspectos esenciales del procesamiento de entradas corticales en los GB provocando los signos clínicos de parkinsonismo. Como el globo pálido (GP) recibe aferencias tanto del estriado (inhibitorias) como del subtálamo (excitatorias), decidimos estudiar los efectos de la lesión nigroestriatal sobre la respuesta a la estimulación eléctrica focal de la corteza motora a nivel de neuronas aisladas del GP. En ratas lesionadas con 6-OHDA (un difundido modelo de parkinsonismo) 98% (26 de 27) de las neuronas del GP respondieron a la estimulación de un único sitio cortical contra 23% (4 de 17 neuronas) en animales control ($p<0.001$, test exacto de Fisher). Este incremento de respuestas se debe tanto a una mayor incidencia de excitaciones (96% vs 23%, $p<0.001$) como de inhibiciones (40% vs 12%, $p<0.05$). También encontramos una integración anormal de respuestas inhibitorias (vía córtico-estriado-GP) y excitatorias (vía córtico-subtálamo-GP) en neuronas del GP: ninguna de las neuronas de ratas control mostró respuestas trifásicas excitación-inhibición-excitación contra 6 de 27 en ratas 6-OHDA ($p<0.05$). Estos resultados indican: i) la representación de un foco de actividad cortical está distribuida más ampliamente en el GP en el parkinsonismo experimental, hecho que sugiere una degradación de la capacidad de procesamiento en paralelo; ii) esta alteración se explicaría por una transferencia incrementada de actividad a través de las vías córtico-estriado-GP y córtico-subtálamo-GP; iii) la presencia de mayor número de respuesta trifásicas en ratas 6-OHDA sugiere mayor convergencia de información de las vías córtico-estriado-GP y córtico-subtálamo-GP sobre neuronas del GP.

**NEUROCIENCIAS 2: CLÍNICA Y PATOLOGÍA 2 -
NEUROQUÍMICA Y NEUROFISIOLOGÍA 2**

173. (6647) LOBULO PREFRONTAL: VARIACIONES UNIDIMENSIONALES CON LA EDAD EN IMAGENES DE RESONANCIA MAGNETICA. GÓMEZ, ELENA; MERLO, ALICIA; ALBANESE, EDUARDO; MIÑO, JORGE; SAUBIDET, ADOLFO; INGRATTA, ADRIANA; MASCITTI, TOMÁS; ALBANESE, ALFONSO M.

Facultad de Medicina, Universidad del Salvador. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Hospital Francés

En el estudio de variaciones morfológicas cerebrales relacionadas con la edad y el sexo se utilizan generalmente medidas de volumen. Objetivo: Determinar posibles variaciones unidimensionales del lóbulo prefrontal (LPF) con el avance de la edad en ambos sexos a través de siete longitudes radiales. Material y método. En imágenes parasagitales de resonancia magnética equidistantes del plano sagital medio de sujetos normales diestros, 35 masculinos y 64 femeninos (edad 17-84 años) se midieron (programa Scion Image for Windows), las longitudes de 7 segmentos radiales (1 a 7 de dorsal a ventral) con vértice en el extremo anterior del borde dorsal del genu del cuerpo calloso y que finalizan en los bordes de la imagen del LPF, limitando entre ellos 6 ángulos de 30 grados. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre la longitud de cada segmento y la edad y entre la longitud de segmentos homónimos. Resultados: Los r entre longitud de los segmentos y la edad son negativos y estadísticamente significativos a excepción del correspondiente al segmento más ventral. Los valores de r correspondientes a los segmentos 1 a 7 para el grupo masculino en el hemisferio izquierdo son -0.41; -0.60; -0.62; -0.57; -0.45; -0.37; -0.28 y en el derecho -0.52 -0.53 -0.63 -0.64 -0.59 -0.36; -0.19 y para el femenino -0.47; -0.47; -0.49; -0.68; -0.36; -0.27; -0.19 y -0.58; -0.69; -0.67; -0.71; -0.43; -0.27; -0.21. Los r entre la longitud de segmentos homónimos son positivos y estadísticamente significativos. Estos resultados obtenidos con valores unidimensionales permitieron observar que con el avance de la edad se produce disminución en el lóbulo prefrontal en ambos sexos en regiones relacionadas con funciones que se modifican con el envejecimiento. La correlación positiva y estadísticamente significativa entre cada segmento y su contralateral sugiere correspondencia estructural interhemisférica en la región.

174. (6833) ESTUDIO DEL MECANISMO INVOLUCRADO EN LA ESTIMULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ASPARTATO POR INHIBICIÓN DE LA BOMBA DE SODIO. BERSIER, M.G.; MIKSZTOWICZ, V.; PEÑA, C.; RODRÍGUEZ DE LORES A, G.

Instituto de Biología Celular y Neurociencias «Prof. E De Robertis», Fac. Med., UBA, Fac. Med, Cat.Farmacol e IQUIFIB, Fac.Fcia y Bioquímica.

La inhibición de la bomba de sodio aumenta la liberación de neurotransmisores. En trabajos anteriores de este laboratorio se aisló una fracción del cerebro, endobaina E, con propiedades similares a la ouabaína, incluyendo el aumento de la liberación de neurotransmisores. El objetivo de este trabajo fue analizar si ese efecto era sobre la exocitosis y/o por inversión del transportador y la posible participación de los receptores glutamatérgicos. Se trabajó con sinaptosomas de corteza cerebral de ratas Wistar aislados por centrifugación diferencial y gradiente de Percoll. La endobaina E se aisló de la fracción soluble de corteza cerebral de rata mediante HPLC de intercambio aniónico. Los sinaptosomas fueron preincubados en buffer HEPES-solución salina con D-[³H]Aspartato 1 mM (15 min a 37°C), y luego incubados en presencia de drogas (60 seg) a 37°, 25° y 18°C, con respecto al control sin agregados (100 % de liberación), la liberación de aspartato por endobaina E a 37°, 25° y 18°C fue 370±30 (4), 296±4 (4) y 261±18 (4), respectivamente. En presencia de 1

mM ouabaína, la liberación fue de 270 ± 17 (5), 192 ± 55 (4) y 132 ± 18 (7). Con los antagonistas de los receptores glutamatergicos se observó que el MPEP (selectivo para el subtipo mGluR5) disminuyó un 50% la liberación por la ouabaína, mientras que no alteró el efecto de la endobaína E. Otros antagonistas como el LY 367385 (selectivo para el subtipo mGluR1) y la dizocilpina (selectivo para receptor el ionotrópico NMDA), no mostraron efecto. Dado que al disminuir la temperatura se ve una disminución en la liberación con endobaína y ouabaína, se podría inferir que el mecanismo de liberación afectado es la inversión del transportador y no la exocitosis y que el receptor mGluR5 participaría en el efecto de la ouabaína sobre la liberación de neurotransmisores.

175. (6867) GRUPOS NEUROQUÍMICOS CEREBRALES ACTIVADOS POR UNA EXPANSIÓN DE VOLUMEN SANGUÍNEO (EVS) HIPERTÓNICA. GODINO, A¹; ANTUNES-RODRIGUES, J²; VIVAS, L¹.

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra INIMEC¹, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Riberão-Preto, Brasil.²

Evidencias de nuestro laboratorio indican que la EVS isotónica, sensada principalmente por receptores de volumen, activaría a nivel del tronco encefálico grupos neuronales serotoninérgicos y catecolaminérgicos. Estas vías proyectarían a nivel hipotalámico modulando la activación diferencial de neuronas oxitocinérgicas (OT) y vasopresinérgicas (AVP) de los núcleos supraóptico y paraventricular (NSO y NPV); ya que se observó un aumento en la inmunoreactividad a Fos (Ir-Fos) en neuronas OT del NSO y NPV, mientras que este marcador de actividad neuronal estuvo ausente en las neuronas AVP. Además, este antagonismo fue coincidente con los dosajes hormonales realizados para OT y AVP luego de la EVS. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la participación de los grupos neuroquímicos cerebrales involucrados en la regulación de una EVS hipertónica. La misma se realizó mediante la infusión venosa de NaCl hipertónico (0.3 M, 2 ml/100gr.), durante 60 seg. Noventa min. después los animales fueron sujetos al procedimiento de inmunomarcación doble para la detección de Fos y tirosina hidroxilasa (Fos-TH) o serotonina (Fos-5HT) u OT (Fos-OT) o AVP (Fos-AVP) según corresponda. Con relación a los controles (EVS hipertónica simulada) identificamos un incremento significativo Ir-Fos en el órgano vascular de la lamina terminalis (OVLt), y el órgano subfornical (OSF). Así mismo, los grupos catecolaminérgicos A2 y A6 y serotoninérgicos del núcleo dorsal del rafe mostraron un aumento significativo en la doble marcación Fos-TH y Fos-5HT. En el hipotálamo se observó un incremento de Fos tanto en el sistema oxitocinérgico como vasopresinérgico de los NSO y NPV. Nuestros resultados sugieren que la EVS hipertónica sería sensada a través de receptores osmóticos presentes en el OVLt y SFO, además de los receptores de volumen, y sus respuestas centrales involucrarían la participación de vías serotoninérgicas y catecolaminérgicas del tronco encefálico, y oxitocinérgicas y vasopresinérgicas del hipotálamo. Subsidiado por CONICET, ANPCyT y CnPQ.

176. (6898) LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE EPINEFRINA INDUCE UNA EXPOSICIÓN DE RECEPTORES GABA A EN SINAPTOSOMAS DE CEREBRO ANTERIOR DE POLLOS, EN FORMA ADITIVA AL INDUCIDO POR UN ESTRÉS AGUDO. CID, MARIANA PAULA; SALVATIERRA, NANCY ALICIA; ARCE, AUGUSTO

Cátedra de Química Biológica FCEFyN UNC. Química Biológica, Facultad Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC.

La liberación de catecolaminas adrenales, como la epinefrina, es una respuesta fisiológica a eventos estresantes, constituyendo una de las diversas formas del organismo para afrontar un estresor. Dicha liberación posee la capacidad de afectar la formación de la memoria, mediada en gran parte por la acción de

esta hormona sobre la liberación de norepinefrina en SNC. Estudios conductuales y farmacológicos sugieren una interrelación entre el sistema noradrenérgico y GABAérgico. Además, el estrés por inmersión parcial en agua, en pollos, induce un reclutamiento de receptores GABAA (RGABAA). El objetivo de este trabajo fue observar si la epinefrina administrada sistémicamente tiene un efecto modulador sobre dicho reclutamiento en cerebro anterior de pollo. Pollos de 10 días de edad fueron distribuidos en grupos, Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3, inyectados con salina, epinefrina 0,25 y 0,50 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Posteriormente, cada grupo fue estresado por inmersión parcial en agua durante 15 min. Inmediatamente después fueron sacrificados por decapitación, los hemisferios cerebrales disecados y obtenida la fracción sinaptosomal cruda, en la cual se determinó la Fmáx del [3H]-flunitrazepam a su receptor. Las Fmáx incrementaron respecto de su correspondiente control no estresado, 27% (P < 0,01), 44% (P < 0,01) y 79% (P < 0,01) en cada grupo respectivamente. Cuando los pollos fueron estresados, la epinefrina indujo un incremento del 13% (P < 0,01) entre los Grupos 1 y 2 y, del 12% (P < 0,01) y del 25% (P < 0,01) entre el Grupo 3 y los Grupos 2 y 1, respectivamente. Los resultados sugieren que el incremento en la densidad del RGABAA inducido por la epinefrina podría transcurrir por un mecanismo diferente al inducido por el estrés agudo.

177. (7275) CAMBIOS EN LA HISTO-CITOARQUITECTURA DE LA CORTEZA CEREBRAL DE RATAS SOMETIDAS A ASFIXIA PERINATAL. CACCURI, ROBERTO L.; CEBRAL, ELISA; LOPEZ-COSTA, JUAN JOSÉ; LÓPEZ, ESTER MARÍA; REY FUNES, MANUEL; HUARTE, MARÍA; COIRINI, HÉCTOR; LOIDL, C. FABIÁN

Facultad De Medicina, UBA IBCyN «Prof. Dr. E.de Robertis», IByME, Depto Bioquímica Humana. Fac. Medicina, UBA

La asfixia perinatal (AP) severa puede producir la muerte o secuelas neuropsiquiátricas que se evidenciarán a largo plazo, dentro de las cuales ha sido incluida la esquizofrenia. Análisis anatomopatológicos post-mortem de pacientes con esquizofrenia evidenciaron en la capa I de corteza cerebral, células de Cajal-Retzius, que difícilmente se observan en adultos normales. En estudios previos de nuestro laboratorio demostramos, utilizando un modelo experimental de AP por inmersión transitoria en agua, cambios en la expresión neuronal de óxido nítrico sintasa y de metaloproteasa-8 en corteza cerebral. Dado que tanto el óxido nítrico como la metaloproteasa-8 son inductores de cambios plásticos en el SNC, bien podrían alterar la histoarquitectura cortical. Con este objetivo, estudiamos las diferentes capas de la corteza cerebral mediante la técnica histoquímica de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforasa (NADPH-d) en ratas macho de 45 días en un grupo control (CTL, n=6) y otro sometido a AP (n=7). Al ser comparado con el CTL, observamos en el grupo AP los siguientes cambios: células que corresponderían fenotípicamente a las Cajal-Retzius en la capa I; reducción en el número de neuronas en las capas II-III; neuronas citomegálicas con prolongaciones tortuosas en las capas IV-V; disminución del número de neuronas de Martinotti de morfología abusada en la capa VI y abundantes neuronas en el cuerpo caloso. Nuestros resultados reproducen, en un modelo experimental, observaciones de la anatomopatología de la esquizofrenia con cambios en la histo-citoarquitectura cortical. La presencia de neuronas en el cuerpo caloso sugiere un trastorno de la migración neuronal. Este modelo experimental aporta evidencias sobre la presencia de alteraciones del neurodesarrollo en la corteza cerebral inducidas por AP que podrían ser el sustrato fisiopatológico de enfermedades neuropsiquiátricas como la esquizofrenia. (UBACYT - M020)

178. (7346) UN RECEPTOR DE MEMBRANA DE TRYPANOSOMA CRUZI UNE LIGANDOS NICOTÍNICOS Y ESTIMULA SEÑALES DE CALCIO. VENERA, GRACIELA; BOLLO, MARIANA (1); MACHADO, ESTELA (1); BISCOGLIO, MIRTHA

IQUIFIB (UBA-CONICET). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Junín 956 (1113) Buenos Aires. Argentina. (1) Departamento de Biología Molecular, UNRC. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Se demostró previamente que la nicotina (1×10^{-5} M) aumenta la concentración de calcio en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* de modo independiente de la concentración de calcio extracelular. El incremento es bloqueado por alfa-bungarotoxina (alfa-BgTx) pero no por atropina. Además, la carbamilcolina provoca cambios en la concentración de calcio citosólico en epimastigotes de *T. cruzi* en condiciones experimentales en las que se anula la activación de PLC y por consiguiente, el aumento de IP3. Por otra parte, se observó que las membranas del parásito unen 125I alfa-BgTx, unión que es inhibida por carbamilcolina ($IC_{50} = 7.6 \times 10^{-7}$ M) y nicotina ($IC_{50} = 1 \times 10^{-7}$ M) (SAIB 2001). El conjunto de resultados condujo a identificar la especie molecular responsable de los efectos mencionados. La preparación de membrana se sometió a SDS-PAGE y se transfirió a nitrocelulosa. Se detectó una banda de 24 kDa que une 125I alfa-BgTx así como anticuerpos policlonales de conejo contra el receptor nicotínico (nAChR) de *Torpedo californica*. Con el propósito de purificar la proteína, la preparación de membrana se sometió a cromatografía de afinidad utilizando Affigel-10 con bromoacetilcolina como ligando. El SDS-PAGE del material eluido con carbamilcolina evidenció una purificación parcial; se llevaron a cabo: a) ensayos de DOT sobre nitrocelulosa, que indicaron que uno o más componentes de la preparación de membrana une 125I alfa-BgTx así como anticuerpos anti-nAChR; b) SDS-PAGE y transferencia a nitrocelulosa que permitió detectar - tanto con los anticuerpos policlonales como por la unión de 125I alfa-BgTx - una banda discreta de 24 kDa. Se postula la existencia de un receptor de 24 kDa en las membranas de los epimastigotes de *T. cruzi* capaz de unir ligandos nicotínicos, unión que estimula la apertura de canales de calcio de depósitos intracelulares.

179. (7467) INFLUENCIA DE LA EDAD EN RESPUESTA A LA RADIACIÓN GAMMA FRACCIONADA SOBRE CEREBRO DE RATA. PÉREZ DE LA HOZ, ALEJANDRO; EVELSON, PABLO; RIGANO, LUCIANO; YAKISICH, J SEBASTIÁN; TASAT, DEBORAH

Escuela de Ciencia y Tecnología-UNSAM, Buenos Aires, Argentina. Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA, Texas A&M University System Health Science Center 3

En radioterapia, la radiación gamma (RG) es administrada mediante esquemas de dosis fraccionada o única para el tratamiento de diversas patologías cerebrales. Aunque es conocido que en tejido cerebral normal, el envejecimiento y la radiación gamma afectan la generación de especies activas del oxígeno (EAO), los efectos de la RG fraccionada en diferentes grupos etarios no han sido caracterizados. En este trabajo evaluamos el efecto de la RG fraccionada (18 Gy totales en 6 días) vs única (18 Gy) sobre EAO en cerebro total de ratas Wistar jóvenes (J: 1-2 meses), adultas (A: 8-9 meses) y senescentes (S: > 12 meses). La generación de EAO se evaluó en homogeneizado de cerebro mediante el nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El análisis por TBARS mostró en J un incremento ($66 \pm 15\%$, $X \pm ES$, $P < 0.001$) mientras que en A ($59 \pm 7\%$, $P < 0.05$) se observó una disminución y en S no ($84 \pm 30\%$, $P > 0.05$) para RG fraccionada con respecto a los respectivos controles (100%). En estudios previos hemos demostrado que la generación de EAO inducido por una dosis única de RG es mayor en A y S. En conjunto, estos datos indican que la generación de EAO en cerebro normal es dependiente del esquema de tratamiento radiante. Estos resultados sugieren que la diferencia en la respuesta etaria al esquema de tratamiento podría tener implicancias clínicas en el tratamiento radiante especialmente en jóvenes y adultos.

180. (7482) LOCALIZACIÓN DE LA NADPH DIAFORASA/ SINTASA DE OXIDO NÍTRICO EN NEURONAS DE LA CORTEZA CEREBRAL DE PACIENTES CON EPILEPSIA

FOCAL QUIRÚRGICA. D'ALESSIO, L; LOPEZ-COSTA, JJ; SEOANE, E; CONSALVO, D; ODDO, S; GIAGANTE, B; SILVA, W; GUELMAN, L; KOCHEN, S; ZIEHER, LM

1ª Cátedra de Farmacología, Medicina, UBA. Hospital Ramos Mejía. Instituto E de Robertis

La producción de Oxido Nítrico (NO), ejerce una regulación negativa sobre la actividad ictal en determinadas condiciones experimentales. Se ha descrito un aumento de la NO Sintasa (NOS) en corteza de pacientes epilépticos, a expensas de un aumento de la población de neuronas nitrérgicas tipo II, con posibles funciones neuroprotectoras. Se obtuvieron muestras de 5 x 5 mm de corteza temporal de tres pacientes con epilepsia temporal refractaria y esclerosis hipocámpal asociada, y de corteza prefrontal en un paciente con displasia frontal. Las muestras fueron fijadas por inmersión en solución de paraformaldehído al 4% durante 24hs. Se obtuvieron secciones de vibrátomo que fueron procesadas por histoquímica de NADPH diaforasa. Las secciones fueron incubadas en una solución conteniendo 1mg/ml de B-NADPH y 0,2 mg/ml de nitroblue tetrazolio en buffer fosfato 0,1 M a 37°C durante 1 hora. Las secciones fueron montadas con PBS/glicerol, observadas y fotografiadas con un microscopio óptico Zeiss Axiophot. En todas las secciones encontramos dos tipos de neuronas nitrérgicas descritas en los mamíferos. Se observó un predominio de neuronas tipo II en capas II y IV. Estas neuronas son de menor tamaño, más abundantes, menos reactivas, se visualizan núcleos negativos, y las prolongaciones son arrosariadas. Por su morfología se distinguen dos subtipos; granulosa y fusiformes. Las neuronas tipo I fueron observadas principalmente en capas más profundas, V y VI, y en sustancia blanca subcortical. Presentan mayor tamaño y mayor reactividad, y sus prolongaciones poseen espinas dendríticas. Los hallazgos del presente trabajo concuerdan con resultados de otros investigadores y muestran un patrón diferencial en la distribución de las neuronas nitrérgicas tipo I y II en la corteza temporal y frontal de pacientes con epilepsia focal.

181. (7751) CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CORRIENTES ACTIVADAS POR HIPERPOLARIZACIÓN EN NEURONAS PIRAMIDALES DE CORTEZA PREFRONTAL DE RATÓN. POMATA, P. E. (1); POZZO-MILLER, L. D. (2); CALVO, D. J. (1)

(1)Depto. Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEyN-UBA. Bs As, Argentina. (2)Dept. of Neurobiology, UAB, Birmingham AL, USA.

En células excitables las corrientes catiónicas activadas por hiperpolarización (IHA) pueden regular el potencial de reposo, la actividad oscilatoria de disparo en ráfagas y la integración de señales dendríticas. Existen dos tipos de IHA: Ih, mediada por canales HCN permeables a Na⁺ y K⁺, e Ikir, mediada por canales de K⁺ tipo «inward rectifier». En neuronas de la corteza cerebral sus funciones no han sido esclarecidas. En este trabajo caracterizamos ambas corrientes en neuronas piramidales de la lámina V de rebanadas de corteza prefrontal de ratones, mediante registros de «patch-clamp» en configuración «whole-cell» en combinación con el análisis simultáneo de imágenes de fluorescencia de células cargadas con un colorante sensible a la concentración de Ca²⁺ (OGB-1). Para aislar cada una de estas corrientes se usaron criterios cinéticos y bloqueantes selectivos (ZD-7288 y Cs⁺ para Ih, y Ba²⁺ para Ikir). El curso temporal de activación de Ih fue lento y biexponencial ($t_1: 169 \pm 28$ ms y $t_2: 1306 \pm 89$ ms) y se necesitaron intervalos mayores a 2 segundos para llegar a la amplitud máxima (436 ± 35 pA). La activación de Ikir fue rápida alcanzando una amplitud máxima promedio de 249 ± 31 pA en 58 ± 6 ms. El bloqueo de Ih con ZD-7288 20µM en ausencia de estímulo provocó una hiperpolarización de 9 ± 3 mV, indicando una activación parcial de Ih en el reposo. Además, durante la estimulación, ZD 7288 provocó una inhibición de la hiperpolarización post-potencial de acción (AHP). Finalmente se observó que el bloqueo de Ih aumentó, en la dendrita apical, la entrada de Ca²⁺ evocada por potenciales de acción propagados

en forma retrógrada. En el presente trabajo se realizó una caracterización funcional de lh e lkir en neuronas corticales. Se encontraron evidencias de la participación de lh en el control de la excitabilidad, específicamente en el mantenimiento del potencial de reposo, sobre las propiedades de disparo de espigas y sobre la regulación de la entrada de Ca²⁺ a estas neuronas.

182. (7787) CEFALEA EN RACIMOS Y EJE HIPOFISOGONADAL. REPORTE PRELIMINAR. FIGUEROLA, MARÍA DE LOURDES; ROPELATO, MARÍA GABRIELA; LESTON, JORGE; BARONTINI, MARTA

CEDIE, CONICET, Htal de Niños R Gutiérrez, División Neurología Htal de Clínicas, Buenos Aires.

La cefalea en racimos prepondera en hombres en los que existe una exacerbada virilidad somática observándose un aspecto masculinizado en las pocas pacientes mujeres. Existiría un terreno biológico para esta distribución epidemiológica. Los esteroides sexuales modulan el sistema opioide endógeno y probablemente la nocicepción. En los varones afectados los niveles de testosterona tienen un rango ampliamente variable según los autores y ha sido descripta una disminución de la respuesta de LH a la LHRH así como una relación directa en vez de inversa entre nivel de LH basal y testosterona. Se postuló entonces un compromiso hipotalámico en estos pacientes. A partir de estas observaciones clínicas y bioquímicas planteamos estudiar el eje gonadal en mujeres en edad reproductiva portadoras de cefalea en racimos durante la etapa dolorosa. Incluimos hasta el momento 7 pacientes con edades entre 20 y 38 años, con diagnóstico de cefalea en racimos según la IHS y con ciclos regulares. Las extracciones se realizaron entre los días 2 y 5 del ciclo en todos los casos. Se determinaron testosterona (T[0]), estradiol (E[2]) y progesterona (P[4]) basales y LH y FSH basal y a los 30 y 60 minutos de la inyección iv de LHRH. De los resultados obtenidos surgen dos subgrupos de pacientes uno (n=4) con respuesta adecuada a la prueba y otro (n=3) con niveles de LH y FSH basales aumentados (13,4; 27,6; 34,3 mUI/ml y 13,8; 40,4; 109mUI/ml respectivamente) e hiperrespuesta a la prueba (LHmax 30,4; 116; 72mUI/ml y FSHmax 16,9; 140; 55,8 mUI/ml). Los niveles de P[4] y T[0] estuvieron dentro de los valores controles para el laboratorio. En cuanto al E[2] se observaron niveles normales en todas las normogonadotróficas. En dos de las tres pacientes del otro subgrupo se registraron valores disminuidos de E2 (10 y 12 pg/ml). Estos hallazgos preliminares sugieren que además del postulado compromiso central existiría una falla ovárica primaria en un subgrupo de portadoras de cefalea en racimos.

183. (7984) ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE MBP Y β III-TUBULINA EN NERVIOS SURALES HUMANOS CON NEUROPATÍA PERIFÉRICA: CORRELACIÓN ANATOMOCLÍNICA. MUSOLINO, PATRICIA L.; SEVLEVER, GUSTAVO (1); SETTON, C. PATRICIA (2); VILLAR, MARCELO J.

Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral. (1) Depto. de Neuropatología, FLENI, (2) Fac. de Farm. y Bioq., UBA, IQUIFIB-CONICET

Las neuropatías periféricas se caracterizan por presentar alteraciones de la sensibilidad, dolor, debilidad muscular y/o síntomas autonómicos. Afectan al 2,4% de la población constituyendo una grave afección de la salud y la economía mundial. Clásicamente, y de acuerdo al tipo de alteración predominante, se las ha dividido en axonales, desmielinizantes y mixtas. Hasta la fecha existen escasos estudios que describan el patrón de expresión de las proteínas constituyentes de la mielina y del axón en pacientes con neuropatía. La proteína básica de mielina (MBP) y el isotipo neuronal específico de β -tubulina, β III-tubulina (β III-tub), representan componentes estructurales fundamentales de la mielina y de la fibra respectivamente. En este trabajo se estudiaron los cambios acontecidos en la ultraestructura del axón a través de la expresión de β III-tub, así como la degeneración de la vaina de mielina mostrada por la aparición de acúmulos MBP inmunoreactivos en pacientes con diagnóstico clínico y anatomopatológico

de neuropatía periférica. Se estudió también la correlación entre los cambios estructurales del nervio y la funcionalidad de los mismos. Nervios surales de biopsias fueron fijados y procesados con anticuerpos contra β III-tub y MBP con técnicas de inmunohistoquímica. Se obtuvieron imágenes con microscopía confocal de la colocalización de ambas proteínas. Los síntomas y signos al momento de la obtención de la biopsia junto con la información proveniente de electromiogramas y potenciales evocados sensitivos fueron comparados con las imágenes obtenidas por microscopía electrónica y confocal. Estos resultados demuestran la existencia de una correlación entre la severidad y tipo de neuropatía con la inmunodetección de los componentes estructurales tanto de los neurotúbulos como de las células de Schwann.

184. (8007) ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA HIPOCAMPAL EN RATONES LONGEVOS CARENTES DE LA PROTEÍNA PRION. MAGLIO, LAURA; ALMIRON, ROMINA; RAMIREZ, OSCAR

Departamento De Farmacología, Facultad De Ciencias Químicas, UNC.

La proteína prion sería la causante de ciertas enfermedades neurodegenerativas cuando esta se modifica. Estudios previos de nuestro laboratorio realizados en ratones desprovistos de la proteína prion, (Prnp 0/0) de 3 meses de edad, mostraron una disminución en el umbral para generar LTP en el hipocampo comparado con los controles (Prnp +/-). Además, no se observaron diferencias en el mantenimiento del LTP hasta 180 min. Por hibridación in situ de las subunidades que codifican para el receptor NMDA, hallamos un incremento significativo en la subunidad NR2A y NR2B para los ratones knockout. De lo que concluimos que la transmisión sináptica hipocampal glutamatergica se encuentra facilitada en dichos animales. En el presente trabajo estudiamos si esos cambios observados en animales jóvenes perduraban en los animales longevos. Para lo cual medimos el umbral para la generación del LTP en rebanadas de hipocampo de ratones de 8 meses. El umbral fue de 91 ± 8.2 para Prnp 0/0 y 155 ± 7.4 para Prnp +/- . Por otra parte, no se observó en estos animales el decaimiento es normal, en animales controles durante los 180 min posteriores a su generación. Además el RNAm para las subunidades que codifican para el receptor NMDA reveló un incremento en la subunidad NR2A, $0,48 \pm 0,08$ para Prnp 0/0, comparado con $0,19 \pm 0,05$ células/mm² para Prnp +/- y en la subunidad NR2B, $0,46 \pm 0,05$ para Prnp 0/0 comparado con $0,33 \pm 0,05$ células/mm² para los animales controles. De estos resultados podemos concluir que la transmisión sináptica hipocampal en animales Knockout longevos, se encuentra modificada, observándose una mayor excitabilidad y una conformación del receptor NMDA que podría favorecer un mayor influjo de calcio, lo cual indicaría un rol protectorio para dicha proteína en animales controles.

**NEUROCIENCIAS 3: CLÍNICA Y PATOLOGÍA 3 /
NEUROQUÍMICA Y NEUROFISIOLOGÍA 3**

185. (7007) LAS DOS CARAS DE LA HIPOXIA PERINATAL. VALDEZ, SUSANA; LAMA, MARÍA CRISTINA; TERUYA, CECILIA; EZQUER, MERCELO; PATTERSON, SEAN; SELTZER, ALICIA

IHEM FAC Ciencias Medicas UNCuyo. Facultad de Ciencias Medicas, IHEM (CONICET) e IMBECU-CRICYT. Mendoza.

Los efectos de la hipoxia (H) sobre el desarrollo del SN pueden ser benéficos o letales según el momento en que ocurre, la intensidad y la duración de la misma. El propósito de nuestro trabajo es conocer los mecanismos de reparación del tejido nervioso que genera el cerebro inmaduro para compensar lesiones de naturaleza excitotóxica. Estudiamos parámetros bioquímicos, tisulares y conductuales manifestados después de someter a

crías de ratas a una H aguda (6.5% de O₂ durante 70 min) en el día 4to post natal (equivalente a tercer trimestre de gestación en el humano), o como pre-condicionante de una hipoxia-isquemia en el día 7mo. post natal (HI-modelo de Rice- Vanucci). Métodos: Medimos lactato sérico por espectrofotometría; la proteína sináptica GAP43 por WB e inmunohistoquímica (Monoclonal Ab 9 -1E12); las lesiones en áreas cerebrales por la técnica Cuproargéntica (De Olmos) y conducta mediante el Test de Evitación Pasiva para memoria. Resultados: la hipoxia induce un aumento de la concentración de lactato sérico ($p < 0.001$ vs control). La intensidad de la lesión histológica ocasionada por la HI fue menor cuando se preconditionó con H 24 h antes, y esta mejoría se acompaña con una disminución de la concentración de lactato ($p < 0.05$ vs HI). GAP43 se encontró aumentado ($p < 0.05$) en el cuerpo estriado a la semana posterior a la H y no se vio alteración en la memoria (retención) a los 3 meses de edad en los animales hipoxiados, aunque una subpoblación de estos demostró ser hipoactiva. Conclusión: La H global aguda genera un estímulo neurogénico transitorio en determinadas áreas cerebrales favoreciendo los procesos de reparación de los tejidos. Estas acciones serían efectivas solo entre las 24 y 48h previas a una lesión isquémica. Sin embargo no se descartan posibles secuelas funcionales y conductuales que serían generadas por la H global aplicada en el período perinatal.

186. (7048) EL AUMENTO EN LA NITROSILACION PROTEICA POR ASFIXIA PERINATAL INDUCIRIA CAMBIOS DEGENERATIVOS EN LA RETINA. REY FUNES, MANUEL; LOIDL, CÉSAR FABIÁN; LÓPEZ, ESTER MARÍA; RODRIGO-GARCIA, JOSÉ; VEGA, M. CRISTINA; LOPEZ-COSTA, JUAN JOSÉ; COIRINI, HÉCTOR

Facultad De Medicina - UBA. IBCyN "Prof. E. De Robertis"; IByME, Fac.Medicina, UBA, Instituto Cajal, Madrid

Mediante la técnica histoquímica de NADPH-diaforasa, que evalúa en forma indirecta a la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), responsable de la producción de óxido nítrico (NO), nuestro laboratorio ha demostrado alteraciones retinianas inducidas por un modelo experimental de asfixia perinatal (AP). En el presente trabajo la NOS fue estudiada mediante inmunocitoquímica, con anticuerpos contra sus isoformas neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). El impacto de la producción de NO se evaluó mediante anticuerpos contra nitrotirosina (NO-tyr). Para ello hemos analizado secciones de retina de ratas macho de 60 días, de los siguientes grupos: controles (CTL), sometidas a AP durante 20 min en condiciones de normotermia (AP) y AP en hipotermia a 15°C (HIP). Las secciones fueron evaluadas por análisis de imágenes computarizado. Se han observado los siguientes cambios significativos en el grupo AP con respecto a los grupos CTL e HIP: 1) utilizando un anticuerpo anti-nNOS, un aumento del área, densidad óptica relativa y número de células por campo de las neuronas amácrinas; observándose además inmunorreactividad en neuronas horizontales y ganglionares, 2) con anticuerpo anti-iNOS, aumento en la densidad óptica de la zona epirretinal y capa nuclear interna y 3) con anticuerpo anti-NO-tyr, una mayor inmunomarcación en la zona epirretinal y capas plexiforme interna, nuclear interna y nuclear externa. Estos resultados sugieren la participación de la nitrosilación proteica como uno de los responsables de los mecanismos neurodegenerativos que se disparan por AP en la retina. La hipotermia demuestra una vez más, ser un agente terapéutico eficaz para evitar y/o disminuir el desarrollo de la oftalmopatía proliferativa isquémica (UBACYT - M020).

187. (7056) EL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT8 EN HIPOCAMPO DE RATA: MECANISMOS DE REGULACION DE SU LOCALIZACION SUBCELULAR. PIROLI, GERARDO; GRILLO, CLAUDIA; MCEWEN, BRUCE; REAGAN, LAWRENCE

Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA Neuroendocrinology, The Rockefeller University; Pharmacology, Physiology and Neuroscience, USC

El hipocampo es una estructura relacionada con memoria y aprendizaje. Los transportadores de glucosa (GLUTs) están involucrados en dichos procesos pues la glucosa es la principal fuente de energía para el hipocampo. GLUT8 se expresa en hipocampo y otras áreas cerebrales. En esta ocasión, utilizando inmunohistoquímica localizamos GLUT8 en neuronas principales y no principales del hipocampo, pero no en glía. La microscopía electrónica demostró que GLUT8 está asociado a retículo endoplásmico (RE) y a vesículas, pero no a membrana plasmática. Por western blot, localizamos GLUT8 en microsomas de alta densidad (MAD), que corresponderían al RE, y en microsomas de baja densidad (MBD), que corresponderían a vesículas. Para verificar la posible translocación de GLUT8 a la membrana plasmática, empleamos estímulos tales como hiperglucemia e hiper o hipoinsulinemia. En animales en ayuno, una sobrecarga i.p. de glucosa (2 g/kg peso corporal) provocó hiperglucemia e hiperinsulinemia, y estimuló el tráfico de GLUT8 de MBD (Control 100±15% vs Glucosa 52±10, $p < 0.05$) a MAD (Control 100±12 vs. Glucosa 279±30, $p < 0.005$). La diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) provocó hiperglucemia e insulinoopenia, y estimuló el tráfico inverso de MAD (Control 100±10 vs STZ 71±6, $p < 0.05$) a MBD (Control 100±4 vs. STZ 124±6, $p < 0.01$). Ratas en ayuno que tuvieron acceso a comida por 3 horas mostraron efectos similares a los provocados por la sobrecarga de glucosa: MAD Control 100±7 vs. Realimentadas 137±8, $p < 0.01$, MBD Control 100±10 vs. Realimentadas 40±3, $p < 0.001$. En ningún caso se observó asociación de GLUT8 con la membrana plasmática. GLUT8 es sensible a insulina en el hipocampo de rata, pues estímulos que aumentan la insulinemia provocan su translocación a MAD, mientras que la insulinoopenia, aún con hiperglucemia, produce retención de GLUT8 en MBD. Esto confirma que el hipocampo es una estructura sensible a insulina, concordando con estudios recientes que muestran un efecto positivo de la insulina sobre el aprendizaje.

188. 7144 EFECTO TERAPEÚTICO DE LA MELATONINA EN UN MODELO DE UVEITIS EXPERIMENTAL EN EL HAMSTER DORADO. SANDE, PABLO; SALIDO, EZEQUIEL; GOLDIN, ANDREA; KELLER SARMIENTO, MARIA INÉS; ROSENSTEIN, RUTH; SAENZ, DANIEL

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, U.B.A.

La uveítis es un proceso inflamatorio crónico o agudo que afecta primariamente la úvea y puede extenderse a la retina, provocando un déficit significativo de las funciones visuales. En forma reciente, hemos iniciado el desarrollo de un modelo de uveítis inducida por la inyección intravítrea de lipopolisacárido bacteriano (LPS) en el hámster dorado. El aumento de los niveles de óxido nítrico (NO) y el daño oxidativo han sido involucrados como factores causales en el desarrollo de la uveítis. Evidencias previas indican que la melatonina es un potente antioxidante e inhibidor de del sistema nitrérgico retiniano. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue examinar el efecto terapéutico de la melatonina en la uveítis experimental. Para ello, se examinó el efecto de un pellet subcutáneo de 20 mg de melatonina sobre el número de leucocitos infiltrados y la concentración de proteínas en el humor vítreo, la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS), a través de la conversión de 3H-arginina) y la peroxidación lipídica (por el método de TBARS) en retinas de animales inyectados con LPS. Luego de 24 h de la inyección de LPS se observó un aumento significativo de la actividad de todos los parámetros examinados. La melatonina, que careció de efectos per se, disminuyó significativamente el incremento en el número de células infiltradas (células/ul LPS: 245,8 ± 30, LPS + mel: 56,2 ± 16, $p < 0.01$) y en la concentración de proteínas del humor vítreo (en mg/ml, LPS: 48.9 ± 5, LPS + mel: 14.7 ± 2, $p < 0.01$). Asimismo, la melatonina disminuyó el aumento inducido por LPS en la actividad de NOS (en nmol citrulina/mg prot. 30 min, LPS: 12.1 ± 1, LPS + mel: 6.8 ± 0.5, $p < 0.01$) y en la peroxidación lipídica retiniana (en nmol TBARS/mg prot., LPS: 0.8 ± 0.1, LPS + mel: 0.49 ± 0.08, $p < 0.01$). Estos resultados indican que la melatonina previene el aumento de diversos factores involucrados

en el proceso inflamatorio y podría constituir una nueva estrategia en la terapéutica de la uveítis.

189. (7270) ALTERACIONES EN LA REACTIVIDAD NADPH-DIAFORASA EN MEDULA ESPINAL ESTARIAN INVOLUCRADAS EN LA ESPASTICIDAD ESPINAL. DORFMAN, VERÓNICA B.; BAYONA, JULIO CÉSAR; VEGA, M. CRISTINA; LÓPEZ, ESTER MARÍA; LOIDL, C. FABIÁN; COIRINI, HÉCTOR

Facultad De Medicina - UBA IBCyN "Prof. E. De Robertis"; IByME, Dept. Bioquímica Humana, Fac.Medicina, UBA,

Entre los causales de la parálisis o espasticidad cerebroespinal, el más destacado es la asfíxia perinatal (AP). Estudios previos de nuestro laboratorio indican la participación de especies reactivas del oxígeno, como el óxido nítrico (NO) en la activación de una cascada apoptótica. En el presente trabajo estudiamos la expresión de NOS utilizando la técnica histoquímica de NADPH-diaforasa (NADPH-d) en la médula espinal lumbar de ratas Sprague-Dawley adultas controles (C) y sometidas a AP (n=6/grupo). En esta región se encuentran motoneuronas involucradas en funciones que se han descripto alteradas en individuos espásticos. En el grupo AP, se observaron alteraciones neuronales en los tres núcleos motores presentes (retrodorsolateral, dorsolateral y dorsomedial) con un aumento significativo en el área reactiva (20%, 14% y 20% respectivamente, $p < 0,01$) y en su densidad óptica (38%, 25% y 29% respectivamente, $p < 0,05$) comparado al grupo C. Las neuronas de la columna intermedio lateral (CIL) presentaron un aumento significativo del área reactiva ($C=276,5 \pm 19,1 \mu m^2$, $AP=311,7 \pm 21,5 \mu m^2$, $p < 0,05$), al igual que aquellas ubicadas en las láminas dorsales (lámina II: $C=103,9 \pm 8,6 \mu m^2$, $AP=120,2 \pm 9,6 \mu m^2$, $p=0,04$; lámina III: $C=95,8 \pm 3,8 \mu m^2$, $AP=111,5 \pm 10,1 \mu m^2$, $p=0,02$; lámina IV: $C=173,7 \pm 9,2 \mu m^2$, $AP=201,8 \pm 16,2 \mu m^2$, $p=0,02$, test «t»). Los individuos con espasticidad a consecuencia de una AP, presentan alteraciones en los miembros posteriores, de allí que los cambios observados en las motoneuronas que inervan dichos miembros podrían estar ligados a ésta sintomatología. En forma similar las neuronas de la CIL regulan funciones neurovegetativas también alteradas en esta afección. Por lo tanto, estas observaciones indican que el aumento en la reactividad de NADPH-d en el grupo AP, estaría directamente relacionada con la producción de NO y la fisiopatología de la espasticidad espinal. (UBACYT - M020).

190. (7720) HETEROTOPÍAS PERIVENTRICULARES NODULARES Y SUBCORTICALES: SU COMPARACIÓN EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES ADULTOS CON EPILEPSIA. CONSALVO, DAMIÁN; ALURRALDE, AGUSTÍN; ODDO, SILVIA; GIAGANTE, BRENDA; SILVA, WALTER; SICA, ROBERTO; KOCHEN, SILVIA

Centro de Epilepsia, División Neurología, Hospital Ramos Mejía; UBA; Fundación FEMIEN. Ministerio de Salud de la Nación

Antecedentes: Las malformaciones de la corteza cerebral son un grupo de entidades que se producen durante las etapas del desarrollo embrionario y cuya manifestación clínica puede ser la epilepsia. Estas malformaciones pueden ser diagnosticadas «in vivo» a través de las imágenes por Resonancia Magnética (IRM). Un subtipo particular de estas la constituyen los trastornos en la migración neuronal, dentro de los cuales se ubican las heterotopías (HT). Objetivo: Comparar aquellos enfermos portadores de HT periventriculares (G1) con aquellos portadores de HT subcorticales (G2). Material y Métodos: Se analizaron las variables sexo, edad y edad de inicio de la epilepsia (EI) en años, antecedentes familiares (AF) o prenatales (AP), frecuencia anual de crisis (FAC) y características semiológicas de las crisis, hallazgos en el EEG e IRM y respuesta al tratamiento farmacológico. Resultados: G1 (n=13): 8 mujeres (61.5%), edad promedio 32.9 ± 11.5 (rango 20-59), EI 13.7 ± 7.6 (rango 2-23), AF 1 caso (7.7%), AP en 1 (7.7%), FAC 28.3 ± 31.4 (rango 0-120), crisis multifocales en 5 (38.5%), crisis temporales en 5 pacien-

tes (38.5%), EEG epileptiforme (EEGE) en 7 casos (53.8%), anomalías asociadas en las IRM (AAIRM) en 8 sujetos (61.5%) y 4 casos refractarios al tratamiento (30.7%). G2 (n=8): 6 mujeres (75%), edad promedio 30 ± 9.7 (rango 13-43), EI 11.1 ± 6.3 (rango 1-19), AP 2 (25%), FAC 30 ± 39.5 (rango 0-120), crisis multifocales en 4 sujetos (50%), crisis temporales en 5 pacientes (62.5%), EEGE en 7 casos (87.5%), AAIRM en 3 casos (37.5%) y 1 caso refractario al tratamiento (12.5%). El análisis de las diferentes variables analizadas no mostró diferencias significativas entre ambos grupos. Conclusión: Los enfermos portadores de heterotopías, a pesar de presentarse con características distintivas en los estudios por imágenes, no parecen tener diferencias en sus formas de presentación clínica y/o electrofisiológicas.

191. (7734) HISTORIA FAMILIAR EN PACIENTES CON ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO. KAUFFMAN, MARCELO; CONSALVO, DAMIAN; SCHUSTER, GUSTAVO; KOCHEN, SILVIA

Centro de Referencia en Epilepsia. Hospital Ramos Mejía. Buenos Aires. Fundacion Femien.

Introducción: Factores genéticos podrían estar involucrados en el desarrollo de la esclerosis del hipocampo (EH). Una historia familiar positiva para convulsiones febriles o no ha sido reportada en varias series de pacientes con EH. La presencia de influencias genéticas hace suponer que el proceso pueda ser más generalizado, o al menos, el compromiso del hipocampo sea bilateral. La volumetría temporal mesial permite cuantificar la severidad de la atrofia hipocámpal, así como, identificar la bilateralidad de la afección. Objetivos: Analizar la presencia de una historia familiar positiva (HF) en una población de pacientes con EH. Investigar si la presencia de HF se asocia a características particulares en la volumetría temporal mesial. Materiales y Métodos: Seleccionamos retrospectivamente a aquellos pacientes que tuvieran un diagnóstico de epilepsia del lóbulo temporal con evidencia en la IRM de EH. Investigamos la presencia de historia familiar positiva para convulsiones febriles, afebriles aisladas y epilepsia, dividiendo nuestra población seleccionada en 2 grupos: Esclerosis del Hipocampo Familiar (EHF) y Esclerosis del Hipocampo no Familiar (EHNf). Luego realizamos un estudio de volumetría temporal mesial por IRM de una muestra de estas 2 poblaciones seleccionadas, comparando el volumen del hipocampo derecho (VHD), hipocampo izquierdo (VHI), amígdala derecha (AD), amígdala izquierda (AI) y la razón entre hipocampo menor y mayor (AH). Resultados: EH 83 pacientes; 46 mujeres y 37 hombres; edad media $37,72 \pm 10,9$ años. HF en 19 casos (22 %). EHF (n=8) VHD $2307,5 \pm 444,45$ VHI $2835 \pm 573,54$ AD $2120 \pm 337,98$ AI $2288,8 \pm 298,11$ AH $0,6611 \pm 0,2583$. EHNf (n=22) VHD $2694 \pm 745,2$ VHI $2492,7 \pm 506,22$ AD $1900 \pm 391,13$ AI $1992,7 \pm 450,97$ AH $0,7004 \pm 0,1196$. Las diferencias no alcanzaron significación estadística. Conclusiones: Existe una historia familiar positiva en el 22% de los casos de EH sin asociarse con características particulares en la volumetría temporal mesial. El tipo de crisis más frecuente fue el de convulsiones febriles.

192. (7762) ESTUDIO DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS A GLUTAMATO MGLUR-2/3 Y MGLUR-4A EN UN MODELO DE EPILEPSIA EXPERIMENTAL. EFECTO DE ADENOSINA. CANITROT, JUAN; TORRES, SILVINA N; ANTONELLI, MARTA (1); COIRINI, HÉCTOR (2); GIRARDI, ELENA

(1) IQUIFIB, UBA-CONICET (2) IByME y Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA.

En la generación y mantenimiento de las convulsiones y en el daño excitotóxico, la excesiva concentración de glutamato tiene un papel crucial. Los receptores a glutamato metabotrópicos (mGlu) participan en la transmisión sináptica y en la modulación y plasticidad neuronal pero su acción en la actividad epiléptica es controversial. Los receptores mGlu2/3 y mGlu4a y de

adenosina median su acción acoplados a proteína G. En este trabajo estudiamos el efecto de la administración del convulsivante 3-mercaptopro piónico (MP) y del análogo de la adenosina ciclopentiladenosina (CPA) previo a la administración de MP sobre la expresión de los receptores mGlu2/3 y 4a en cerebelo. La administración de CPA previo a MP demora la aparición y la intensidad de las convulsiones. Se administró diariamente a lotes de ratas Wistar (250-300g), MP 45mg/kg, CPA (2mg/kg), durante 4 días (CPA), o CPA y luego de 30 minutos MP (45mg/kg i.p.) (CPA + MP). Un día después de la última inyección, los cerebelos se procesaron para estudios inmunohistoquímicos usando como anticuerpos antimGluR2/3 y antimGluR4a y la técnica de peroxidasa-antiperoxidasa. Las secciones se evaluaron por análisis computarizado de imágenes. Estudios preliminares determinaron que la administración de MP, CPA y CPA+MP indujeron un incremento en la inmunoreactividad de mGluR2/3 en el cerebelo del 50-80% con una marca en la capa granular, mayor en el límite con las células de Purkinje. El estudio de mGluR4a mostró una marca intensa alrededor del soma de las células de Purkinje observándose en los tratamientos una disminución en la intensidad de la inmunotinción del 40-60%, pero en CPA se observó un mayor número de células reactivas (200%). Estos resultados muestran que los receptores mGlu2/3 y 4a están involucrados de modo diferente en la actividad convulsiva y que el aumento del número de células que expresa mGlu4a por CPA indicaría un refuerzo en la acción protectora.(UBACYT-M020-M033 y CONICET).

193. (7786) LOCALIZACIÓN DE BLANCOS ESPECIFICOS DEL CEREBRO PORCINO MEDIANTE RMI Y TC EN CONDICIONES ESTEREOTACTICAS. ZALOFF DAKOFF, JUAN MANUEL; ROSLER, ROBERTO ; PIETRANI, MARCELO; ARGIBAY, PABLO; DERECHINSKY, MARTIN; ELETA, FRANCISCO; RABADAN, ALEJANDRA

Servicio de Neurocirugía del Hospital Italiano-ICBME

Introducción: La investigación cerebral requiere estudios por imágenes de alta resolución en TC y RMI para guiar biopsias e implantes en modelos animales. Los cerdos son particularmente útiles en investigación en neurociencias debido a sus similitudes anatómicas y fisiológicas con el ser humano. Si bien existen atlas de cerebro porcinos publicados, ninguno correlaciona cortes anatómicos con estudios por RMI y TC. Objetivos: Presentar un estudio anatómico de cerebros porcinos comparativo con estudios por Resonancia nuclear magnética (RMI) y Tomografía computada (TC) en condiciones estereotácticas y mostrar su utilidad potencial en investigación en neurociencias. Material y Métodos: Se utilizaron 5 animales de 3 meses de desarrollo y 20 Kg. de peso los cuales fueron llevados a los estudios de TC y RMI bajo anestesia general inhalatoria, y fueron luego sacrificados. Se realizaron cortes axiales en TC de 3mm de espesor, y cortes de 4 mm de espesor en RMI en los planos axial, coronal y sagital y secuencias T1, T2 y Angioresonancia (RMA). Los cerebros extraídos y formolizados fueron cortados siguiendo la misma orientación que en los estudios por imágenes. Resultados: Los cortes anatómicos y por imágenes fueron comparados y correlacionaron en la identificación de estructuras anatómicas y localización de blancos específicos a través de un sistema estereotáctico no ferromagnético. Este dispositivo es compatible con RMI y TC y se adapta a animales de diferente edad y peso. Conclusiones: Las estructuras anatómicas del cerebro porcino pueden ser identificadas claramente por TC y RMI, correlacionando con la anatomía macroscópica. El modelo permitiría realizar procedimientos estereotácticos guiados como biopsia o implantes en el laboratorio experimental.

194. (7891) LA MAYORÍA DE LOS ANTICUERPOS ANTIGANGLIÓSIDOS DE ISOTIPO G ASOCIADOS A NEUROPATÍAS Y ENFERMEDADES DE LAS MOTONEURONAS ESTÁN PRESENTES SIN SU CONTRAPARTE IgM. LARDONE, RICARDO DANTE¹; COMIN, ROMINA¹; ALANIZ, MARIA EUGENIA¹; MOYANO, ANA LIS¹; VILLA,

ANDRES M.²; BERTOTTI, ALICIA C.³; SICA, ROBERTO E.P.²; NORES, GUSTAVO ALEJANDRO¹

¹Departamento de Química Biológica-CIQUIBIC (CONICET), Fc.Cs.Qcas., U.N.C., Córdoba. ²División Neurología, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires. ³Hospital de Clínicas, UBA, Buenos Aires.

Anticuerpos (Ac) contra diversos glicolípidos autoantígenos (A) son detectados frecuentemente en diferentes trastornos neurológicos. Existen muchas evidencias sobre la capacidad patogénica de estos Ac; sin embargo, es poco lo conocido acerca de su origen. Por otro lado, Ac anti-glicolípidos no-autoantígenos (noA) aparecen en plasma normal durante la respuesta inmune a bacterias. En 467 individuos con neuropatías y enfermedades de las motoneuronas (GBS, MFS, AMAN, MMN, CIDP, ALS), determinamos por HPTLC-inmunotinción: 1) Ac IgG e IgM anti-A (GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GQ1b, LM1) y noA (Gb5, GA1, Glicolípidos»A», Ni7); 2) subclases de Ac IgG contra GM1, GD1a, GD1b (A); y contra Gb5, GA1, Glicolípidos»A» y Ni7 (noA). El 70.02% de los pacientes exhibieron Ac contra uno o más A. En éstos, la presencia de Ac IgG sin Ac IgM de la misma especificidad fue alta (desde un 41.6% para GM1, hasta un 100% para GM3). En contraste, en pacientes y en controles sanos no encontramos Ac IgG anti-noA sin su contraparte IgM anti-noA para ninguno de los antígenos ensayados. Las subclases de IgG mostraron, para los Ac anti-A, un claro predominio de IgG1 por sobre IgG2. Mientras tanto, para Ac anti-noA detectamos una incidencia igual o mayor de IgG2 (respecto de IgG1). La subclase IgG1 indica una generación de Ac anti-A dependiente de Linfocitos T; la IgG2, una respuesta T-independiente. Los diferentes patrones de isotipo (M-G) y de subclases de IgG implicarían diferentes participantes y/o diferentes vías de presentación antigénica involucradas en la respuesta inmune contra A y noA.

195. (7976) DEVELANDO LA FUNCIÓN DE C-FOS CITOPLÁSMICO EN TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO. SILVESTRE, DAVID; GIL, GERMAN; BUSSOLINO, DANIELA; BEATRIZ, CAPUTTO

CIQUIBIC-Dpto Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

c-Fos, el producto del gen de expresión temprana c-fos no es un componente constitutivo de las células pero su expresión es rápida y transientemente inducida en respuesta a diversos estímulos. c-Fos heterodimeriza, principalmente con la proteína c-Jun generando así los factores de transcripción tipo AP-1. AP-1 regula la expresión de diversos genes involucrados en procesos tales como proliferación y diferenciación. En estudios previos (FASEB J., 15: 556, 2001; Mol Biol Cell, 15: 1881, 2004) encontramos que c-Fos, además de su actividad como factor de transcripción, tiene la capacidad de asociarse al retículo endoplásmico (RE) y activar la síntesis de fosfolípidos para la génesis de membrana requerida para eventos de proliferación y diferenciación celular por un mecanismo no-genómico. Se estudió la expresión de c-Fos en tumores humanos de diferente origen: testicular (n=7), pulmón (n=7), mama (n=10) e hígado (n=9) En el 100% de los casos se observó, por inmunofluorescencia, c-Fos citoplásmico y éste co-localiza con marcadores del RE. Se inyectaron intracranalmente células T98G en ratones BalB c/c nude. En el día 5 post inyección, se separaron animales en 3 grupos y se les implantó, en el mismo lugar de la inoculación, una bomba osmótica para la administración en forma continuada de oligonucleótido antisentido o sentido para RNAm de c-Fos o vehículo durante un mes. Se observó desarrollo tumoral en 9 de 10 animales tratados con vehículo, en 6 de 7 con sentido y en 0 de 9 inyectados con oligonucleótido antisentido. Examinamos la expresión de c-Fos en tumores de cerebro ocurridos espontáneamente en ratones B6 mutantes, modelo de Neurofibromatosis tipo 1 humana. En cortes de cerebro, en neurofibromas y en tumores periféricos se observa una alta expresión de c-Fos. Financiado por Agencia Córdoba Ciencias, CONICET, JS McDonnell Foundation. c-Fos citoplásmico activa a las enzimas

residentes del retículo endoplásmico involucradas en la biosíntesis de fosfolípidos, propiciando esto la proliferación de células tumorales.

- 196. (8012) EFECTOS DE LA INGESTA CRÓNICA DE ALCOHOL Y DE LA ABSTINENCIA AGUDA EN LA DESESTABILIZACIÓN DE LA FUNCIÓN SINÁPTICA.** ROZEN, ESTEBAN JAVIER; EZQUER, FERNANDO; PATTERSON, SEAN I.

IHEM - CONICET FCM - UNCuyo

Muchos alcohólicos crónicos exhiben una reducción en el funcionamiento intelectual, debido a cambios en la plasticidad neuronal. En el caso de agravios neurológicos por hipoxia, parte del daño neuronal se da tras la reoxigenación, debido a la excitotoxicidad. Proponemos un paralelismo entre la abstinencia aguda y dicho fenómeno excitotóxico. Planteamos si ciertos efectos del alcohol podrían deberse a la fase aguda de abstinencia y no a la de consumo en sí. La abstinencia de alcohol se relaciona con un aumento en el peligro de convulsiones durante el período temprano de privación. Esta hiperexcitabilidad de rebote podría inducir efectos neurotóxicos en el cerebro. Por esto, hemos hecho un análisis de marcadores de distintas funciones sinápticas en la corteza cerebral, región muy afectada por el alcohol. Ratas intoxicadas crónicamente con alcohol fueron sometidas a un período de abstinencia aguda, analizando los niveles de proteínas en sinaptosomas purificados de la corteza cerebral durante la primera semana de abstinencia, por medio de Immunoblot. Los antígenos seleccionados incluyeron elementos del complejo de fusión de membranas (proteínas SNARE), proteínas asociadas al crecimiento, proteínas G pequeñas (neurotrofismo y plasticidad), proteínquinas de las familias Src y PKC y proteínas de adhesión celular -CAMs- (estabilidad estructural). Encontramos cambios diferenciales para cada grupo de proteínas: la maquinaria fundamental de liberación de neurotransmisores (proteínas SNARE) no se vio notablemente alterada, mientras que las proteínas asociadas al crecimiento sufrieron un aumento transitorio en la abstinencia; las quinasas se vieron más afectadas en la intoxicación crónica que en la abstinencia. Los cambios más trascendentes fueron caídas progresivas en los niveles de CAMs durante los días de abstinencia. Esta disminución puede reflejar una desestabilización de las sinapsis afectadas, debido al efecto de la excitotoxicidad en la abstinencia. Subsidiado por FONCYT 02141 y CIUNC 06/J128.

- 197. (8028) CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL (CRM): EVALUACION ENZIMÁTICA EN HUMANOS.** PASCHINI-CAPRA, ANA ESTER; GINER-AYALA, ALICIA; BACMAN, SANDRA; ANGARONI, CELIA; DODELSON DE KREMER, RAQUEL

CEMECO, Cát.de Pediatría, UNC. Córdoba

Las Mitocondriopatías (M) son un grupo de patologías humanas relacionadas a una disfunción del metabolismo energético, principalmente asociadas con anomalías de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM). La determinación de las AE de la CRM en tejido muscular (TM) es el procedimiento mandatorio actual para la eficacia diagnóstica de pacientes (P) con sospecha de desórdenes en la CRM. La limitación diagnóstica es la variabilidad de los rangos referenciales (RR) foráneos en sujetos humanos normales (CHN) y necesidad de control en cada evaluación individual. Objetivo: 1-Obtener los RR autóctonos en CHN y en tejido músculo de ratones (TMR). 2-Establecer la significación estadística entre ambos controles. 3-Evaluación metodológica de la aplicación de los RR de ambos controles en P con M. Material. Se determinaron las AE de los Complejos (C) I, II, III y IV de la CRM en músculo de 5 CHN, 10 TMR y 8 P por métodos espectrofotométricos. Resultados. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre CHN y TMR. En los 8P seleccionados (expresión de la AE residual como % de la media de los dos grupos señaló: M Definidas: P1 síndrome(S) Barth-like, P2 S MERRF/ MELAS, P4 Encefalomiopatía M y P3

S de Leigh (SL). Los 3 primeros P presentaron una deficiencia del CI(CHN:5,30,57; RC:5,26,51) asociada en P1 y P2 a deficiencias del CIV(CHN:22,28; RC:20,25). El P3 no evidenció ningún defecto. M Posibles: De los 2P con SL, P5 señaló una actividad residual del CIV(CHN:44; RC:40) y el P6 una deficiencia combinada de los CI(CHN:14; RC:13) y II+III(CHN:24; RC:19). El P7 mostró una deficiencia múltiple de los CI, II+III y IV(CHN:9,13,33; RC:8,11,30). M Secundarias: P8 S de Lowe con deficiencia del CI(CHN:31; RC:38). Conclusión. El TMR mostró su validez como control de la AE para estudio funcional de la CRM.

- 198. (8065) CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LA ZONA CA3 DEL HIPOCAMPO INDUCIDOS POR EL ESTRÉS CRÓNICO. PARTICIPACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS) Y DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC).** PALUMBO, MARÍA LAURA (1); RÍOS, HUGO (2); FOSSE, NICOLAS (2); GUELMAN, LAURA (3); CREMASCHI, GRACIELA (1,4); GENARO, ANA MARIA (1,4)

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-CONICET. (2) Inst Biol Celular y Neurociencias, (3) 1ra Cat Farmacol. FMed, (4) Lab Radiosotopos FFyB, UBA.

El estrés crónico ha sido sugerido como un importante factor predisponente para comportamientos relacionados con déficit en la función cognitiva. En un trabajo previo observamos en ratones sometidos a estrés crónico moderado (E) una disminución en su capacidad de aprendizaje y memoria asociada a una menor actividad y expresión de nNOS en el hipocampo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios estructurales y su correlación con la generación de radicales libres, la actividad de nNOS y de PKC. Observamos que los ratones E presentan una mayor producción de ROS inducida por estimulación con NMDA (10(-4) M) ($X \pm ES$, % de estimulación respecto al basal, control (N)= $42 \pm 5\%$, E= $98 \pm 7\%$, n=4). Esto se correlacionó con una menor actividad de la NOS ($p < 0.05$, n=6). El pretratamiento de los hipocampos con staurosporina 10(-9)M (inhibidor de la PKC) produjo una regulación diferencial en la actividad de NOS (N= $31 \pm 10\%$ de estimulación y E= $47 \pm 12\%$ de inhibición respecto a la actividad basal, n=4). El estudio de las isoformas de PKC por western-blot mostró una disminución de la PKC alfa y un aumento de la PKC zeta en E. Por otra parte, en estudios histoquímicos se visualizó un menor número de neuronas así como una menor área ocupada en la región CA3 del hipocampo de animales E ($p < 0.05$, n=4). Se concluye que el estrés crónico induce una alteración en la expresión de isoformas de PKC que podría regular la actividad de nNOS, induciendo una mayor susceptibilidad al daño neurotóxico producido por estrés oxidativo. Estos cambios bioquímicos podrían estar implicados en los cambios estructurales observados en el hipocampo de ratones sometidos a estrés crónico.

NEUROCIENCIAS 4: NEUROQUÍMICA Y NEUROFISIOLOGÍA 4 / CELULAR Y MOLECULAR 1

- 199. (6619) CRH Y ACTIVACIÓN CEREBRAL DE ERK1/2 EN RATONES KNOCKOUT CONDICIONALES DEL RECEPTOR TIPO I DE CRH.** REFOJO, DAMIAN; ECHENIQUE, CARLOS; PACIENZA, NATALIA; MULLER, MARIANNE B.; REUL, JOHANNES M.H.M.; WURST, WOLFGANG; SILABER, INGE; PAEZ PEREDA, MARCELO; HOLSBOER, FLORIAN; ARZT, EDUARDO

Lab Fisiol Biol Mol, FCEN-UBA, IFIBINE-CONICET; Max Planck Institute of Psychiatry, Munich.

La Hormona Liberadora de Corticotrofina (CRH) es clave en el control de las respuestas conductuales, autonómicas y neuroendócrina al stress, actuando a través de receptores de tipo 1 (CRH-R1) y 2 (CRH-R2). Recientemente hemos demostrado en corticotrofos la importancia de la fosforilación de Erk1/2 y su

consecuente activación en la mediación de los efectos de CRH sobre la activación de Nur77 y la inducción de POMC, pero su importancia como mediador de los efectos de CRH en el sistema nervioso es aún desconocida. Para estudiar esto realizamos inmunohistoquímicas con anticuerpos anti-P-Erk1/2 de cortes de cerebro de ratones inyectados i.c.v. con vehículo o CRH, que fueron analizadas por microscopía confocal. Erk1/2 fue activado solo en hipocampo y amígdala basolateral (involucrados en procesamiento cognitivo) pero no en hipotálamo ni en amígdala centromedial (vinculados a funciones vegetativas/neuroendó-crinas). El análisis densitométrico de la señal de las áreas CA1-CA3 del hipocampo y del complejo basolateral de la amígdala indican un incremento significativo en la activación de Erk1/2 ($p < 0.05$) en los animales tratados con CRH vs vehículo ($p < 0.05$). Para establecer el tipo de receptor involucrado realizamos una segunda serie de experimentos en ratones knockout condicionales (CKO) tiempo y región específicos que sufren una ablación genética postnatal del CRH-R1 solo en la región anterior del cerebro. Los animales CKO desarrollan una respuesta fuertemente disminuída al CRH evidenciando un rol crítico del CRH-R1 en la activación cerebral de Erk1/2 inducida por CRH. CRH, a través de sus CRH-R1, activa Erk1/2 diferencialmente en el cerebro privilegiando áreas de procesamiento asociadas a funciones cognitivas por sobre estructuras vinculadas a funciones vegetativas.

200. (6694) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN RATONES CARENTES DE CANALES DE CALCIO DE TIPO P/Q. IBÁÑEZ, LORENA I.¹; DEBA, RUPAL²; STEFANI, ENRICO²; UCHITEL, OSVALDO D.¹

¹Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. FCEN. UBA ²D. Geffen School of Medicine, UCLA. USA.

Los canales de Ca(++) de tipo P/Q median la transmisión sináptica en el sistema nervioso. La ablación génica de este canal genera un animal KO que posee afecciones neurológicas marcadas. En estos animales la liberación de neurotransmisores está mediada por canales de Ca(++) de tipo N y R que compensan la falta del P/Q. Sin embargo no está claro si esta compensación se correlaciona con un aumento en los niveles del mRNA o de las proteínas correspondientes. Por otro lado se sabe que los canales de Ca(++) regulan la expresión de varios genes, por lo que un cambio en los perfiles de expresión de estos canales en el animal KO, podría modificar la expresión de dichos genes. Como objetivo nos propusimos medir los niveles de mRNA de 15 genes utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real. Cuantificamos canales de Ca(++) Cav 2.2, Cav 2.3, Cav 1.3, Cav 3.1, Cav 3.2 y Cav 3.3, como así también algunos genes regulados por los mismos. El RNA extraído se trató con DNasa para evitar la contaminación con DNA genómico. La reacción de RT se realizó a 37°C por 60 min, a partir de 2 µg de RNA total, utilizando como primer oligo-dT. La reacción de PCR se realizó utilizando el kit iQ(TM) SYBR Green Supermix en presencia de primers específicos. Los resultados se expresan relativizados a GAPDH. No encontramos cambios significativos en la expresión de ninguno de los genes para los canales Cav 2.2, Cav 2.3, ni Cav 1.3. Tampoco vimos diferencias significativas en otros genes relacionados. Sin embargo encontramos un aumento significativo en la expresión de canales T en el cerebelo de animales KO, pero no en el resto del cerebro. Este aumento fue de 2 ± 0.4 veces para el subtipo Cav 3.1; 4 ± 0.9 veces para el subtipo Cav 3.2 y 1.4 ± 0.3 veces para el subtipo Cav 3.3. La eliminación de canales P/Q no es compensada por la sobreexpresión de canales de tipo N, L o R a menos a nivel del mRNA. El aumento en la expresión de los canales T en cerebelo podría relacionarse con la actividad epileptiforme descripta en este modelo animal.

201. (6702) REGULACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE SINAPSIS COLINÉRGICAS NICOTÍNICAS EN CÉLULAS CILIADAS DE LA CÓCLEA. KATZ, ELEONORA; GÓMEZ-CASATI, MARÍA EUGENIA; GLOWATZKI, ELISABETH (1); KNIPPER, MARLIES (2); VETTER, DOUGLAS (3); FUCHS, PAUL (1); ELGOYHEN, ANA BELÉN

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (CONICET-UBA). (1) John's Hopkins Med. Sch., USA; (2) THRC, Tuebingen, Germany; (3) Tufts Univ., Boston, USA.

El órgano de Corti, el epitelio sensitivo de la cóclea, contiene células ciliadas que en los mamíferos se dividen en internas (IHC) y externas (OHC). Las IHC transducen los estímulos acústicos en señales eléctricas que son enviadas al sistema nervioso central. Las IHC maduras sólo reciben inervación aferente. Las OHC, implicadas en la amplificación mecánica del sonido y la sintonización fina de la membrana basilar, reciben principalmente una inervación eferente desde la oliva superior. La sinapsis olivococlear es inhibitoria y está mediada por un receptor colinérgico que está formado por las subunidades nicotínicas alpha9 y alpha10. El influjo de calcio a través de este receptor activa canales de potasio dependientes de calcio (SK2). Antes del comienzo de la audición (postnatal (P)12 en ratas), las fibras olivococleares inervan en forma transitoria a las IHC. En este trabajo documentamos esta transición, realizando registros electrofisiológicos de «patch clamp» en el modo «whole cell» en IHC durante el desarrollo. La acetilcolina evocó corrientes en el 88-100% de las IHC entre P3 y P14 y sólo en 1 de 11 IHC en P16-22. La despolarización de los terminales eferentes con alto K⁺, evocó corrientes postsinápticas en el 67% de las IHC en P3, 100% en P7-9, 93% en P12, 40% en P13-14 y en ninguna IHC en P16-22. El gen Alpha9 se expresa en IHC desde estadios embrionarios hasta adultos, sin embargo el gen Alpha10 no se expresa en adultos. Utilizando anticuerpos contra la subunidad alpha10 y el canal SK2, demostramos que en P15 estas proteínas ya no se expresan en las IHC. La correlación entre la expresión de la subunidad alpha10, el canal SK2 y la presencia de sinapsis funcionales en las IHC, sugiere que estos genes están regulados por actividad sináptica. Demostramos, además, que la subunidad alpha10, como se demostró previamente para la subunidad alpha9, es también un componente fundamental del receptor coclear nativo.

202. (6703) LA EXPOSICIÓN A DIETILSTILBESTROL (DES) DURANTE EL PERÍODO POSTNATAL TEMPRANO, DISMINUYE LA PROLIFERACIÓN DE PROGENITORES NEURONALES DEL HIPOCAMPO PERO AUMENTA LA SUPERVIVENCIA NEURONAL. RAMOS, J. GUILLERMO; VARAYOUD, JORGELINA; MONJE, LUCAS; MUÑOZ DE TORO, MÓNICA; LUQUE, ENRIQUE

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

La neurogénesis y gliogénesis postnatal ha sido demostrada en el hipocampo de varios mamíferos. Sin embargo, los factores que regulan la proliferación y diferenciación de células progenitoras in vivo son poco conocidos. El objetivo del trabajo fue investigar el efecto del estrógeno sintético DES, administrado en los primeros días postnatales, sobre la proliferación de células progenitoras neuronales/gliales (PNG) en la zona subgranular (ZSG) del hipocampo de la rata. Crías macho y hembra fueron inyectadas sc, desde el día 1 postnatal (PND1) hasta el PND7, con DES (20 mg/kg/peso) o vehículo. En el PND8 los animales recibieron bromodeoxyuridina (BrdU) y se sacrificaron 4 hs o 13 días después (PND21). En la ZSG del hipocampo se detectaron los PNGs en división celular por doble inmunomarcación para BrdU y nestina. Neuronas maduras y astrocitos se identificaron por expresión de calbindina y vimentina, respectivamente. En el PND8 las células PNG de machos y hembras expuestas al DES presentaron una significativa reducción en la proliferación ($p < 0.01$) y un aumento de la expresión de la proteína p27kip1, que indicaría arresto celular ($p < 0.001$). No hubo diferencias en los niveles de apoptosis detectados por TUNEL ni en la expresión del receptor de estrógenos alfa entre los grupos. En el PND21 los machos estrogenizados presentaron un aumento significativo en el número de neuronas y células gliales maduras que conservaron BrdU ($p < 0.01$, respecto a machos contro-

les). Las hembras de este período se encuentran en evaluación. Los resultados demuestran que el DES disminuye la proliferación de los PNG en la ZSG del hipocampo y sugieren que este efecto sería a través de una vía que involucra a p27kip1. El menor aporte de neuronas al hipocampo por acción del DES sería compensado por una mayor supervivencia neuronal.

203. (6831) PROTEÍNAS ASOCIADAS AL P75NTR MEDIAN LA MUERTE DE NEURONAS HIPOCAMPALES. LAPIDVOLOSIN, MARTA (1); SRINIVASAN, DEEPAK (2); PAN, JING (2); CARTER, BRUCE (3); HEMPSTEAD, BARBARA (4); FRIEDMAN, WILMA J (2)

Depto. Farmacología - UNC. (1) Dep Farmacol UNC (2) Biol Sci Rutgers NJ, (3) Mol Neurosci Vanderbilt TN, (4) Cornell Med NY

El receptor de neurotrofinas p75 (p75NTR) se expresa en diferentes tipos celulares en el sistema nervioso, en donde media diversas funciones tales como supervivencia y muerte celular o inhibición del crecimiento axonal. Para realizar estas complejas funciones p75NTR activa diferentes vías de señalización intracelular. Así, p75NTR media la apoptosis de neuronas hipocampales activando la vía de las caspasas intrínsecas, incluyendo caspasa -9, -6 y -3. Dado que el p75NTR no posee actividad enzimática intrínseca, dicha señalización es transducida por el reclutamiento de proteínas específicas que interactúan con el receptor. Varias proteínas con capacidad de unión al dominio intracelular del receptor han sido identificadas, sin embargo no se conoce cuál/es de ellas participan en funciones específicas en los diferentes tipos celulares. pro-NGF es un ligando mas selectivo del p75NTR que su forma madura (NGF), y es mas efectivo para inducir apoptosis-dependiente de p75NTR en neuronas hipocampales. Asimismo, astrocitos hipocampales expresan p75NTR aunque no ingresan en apoptosis en respuesta a ambos ligandos. El objetivo de este trabajo fue investigar cuál/es de las proteínas asociadas al p75NTR median la apoptosis de neuronas y astrocitos hipocampales en respuesta a NGF o proNGF. Para abordar estos estudios se utilizaron lisados celulares provenientes de cultivos primarios de neuronas (E18) y astrocitos (E21) tratados con NGF (100 ng/ml) o pro-NGF (1 ng/ml). Utilizando inmunoprecipitación seguida de WB se evaluó la asociación de p75NTR con NRIF, NRAGE, RIP-2 y SC-1 en ambos tipos celulares. Los resultados mostraron que NRIF (Neurotrophin Receptor Interacting Factor) se asocia con p75NTR luego del tratamiento con ambos ligandos en neuronas, pero no en astrocitos. Neuronas en cultivo provenientes de ratones NRIF -/- no mueren por tratamiento con proNGF o NGF. NRIF estaría implicado específicamente en mediar la apoptosis mediada por p75NTR en neuronas hipocampales.

204. (6881) EXPRESIÓN DE VEGF EN NEURONAS DEL SISTEMA OLFATORIO DURANTE EL DESARROLLO DE BUFO ARENARUM (AMPHIBIA, ANURA). POZZI, ANDREA; YOVANOVICH, CAROLA; JUNGBLUT, LUCAS; HEER, TAMARA; PAZ, DANTE

DBBE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA Biología del Desarrollo, IFIBYNE-CONICET, DBBE, FCEyN-UBA

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), se sintetiza en diferentes tipos celulares y participa en la regulación de la angiogénesis. Tanto en el SNC como en el periférico VEGF interviene en la diferenciación neuronal y el desarrollo axonal. Se ha localizado VEGF en células «stem» del hipocampo, zona subventricular y bulbo olfatorio (BO) de rata y en retina humana. Existen 4 variantes de VEGF generadas por modificación postranscripcional. En vertebrados, la forma predominante en la mayoría de los tejidos es VEGF165. El epitelio olfatorio es el único tejido neural capaz de reemplazar las neuronas que mueren por nuevas a partir de células progenitoras. Esta nueva formación, diferenciación y crecimiento neuronal durante el desarrollo del sistema olfatorio sugieren un papel para VEGF. Objeti-

vo: Analizar la presencia de VEGF en el sistema olfatorio en el desarrollo y adultos de Bufo arenarum. Se utilizaron larvas de B. arenarum obtenidas por fertilización in vitro. Se analizó por inmunohistoquímica la presencia de VEGF165, E7 y OMP (marcadores específicos de neuronas olfatorias). La identidad de la inmunomarca se confirmó por Western Blot. El epitelio olfatorio mostró presencia de VEGF en todas las etapas larvales analizadas. La doble inmunomarcación con E7 y OMP confirmó la localización neuronal de VEGF. El Western Blot mostró una banda de peso molecular aproximado de 28 KDa, similar a lo descrito en humanos. La presencia de VEGF también se observó en los nervios olfatorio (NO) y vomeronasal (NV), así como en el BO. La inmunomarca fue más intensa en el NV y en el BO accesorio. En adultos, la expresión de VEGF no se detectó en neuronas, nervios ni BO sino que fue evidente en las células de Schwann que rodean a los NO. Se demostró por primera vez la presencia de VEGF en neuronas olfatorias desde etapas tempranas del desarrollo en relación con la diferenciación neuronal. En juveniles y adultos, en cambio, la presencia de VEGF estaría restringida a células de la glia.

205. (6909) ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA) EN CULTIVOS ASTROCITARIOS A LARGO TÉRMINO. VANZANI, MARÍA CECILIA; IACONO, RUBÉN F.; MARTÍNEZ, MACARENA; GAMBONI, MERCEDES M.; ALONSO, ANGEL; BERRÍA, MARÍA I.

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina-UBA Cátedra de Inmunología, Fac. Farmacia y Bioquímica-UBA; Dep Patología, Sanatorio Mater Dei

Objetivo. Dada la comprobada aunque disminuida retención del potencial proliferativo que fuera descrita en un modelo in vitro de envejecimiento, cabía intentar una mas precisa caracterización de esta expresión de PCNA en células a la vez positivas para GFAP, marcador específico de diferenciación astrocitaria. Material y método. A los 1, 2, 9, 15, 20, 30, 45 y 60 días in vitro (DIV) del sembrado de un primer subcultivo de astrocitos murinos, se recogieron muestras para su procesamiento por: a) WB del pellet celular para perfil inmunoquímico de GFAP; b) evaluación con analizador de imágenes CAS 200 mediante CMP (Cell Measurement Program) de núcleos PCNA(+) en astrocitos GFAP(+) mantenidos en monocapa y que habían sido doblemente marcados por inmunoperoxidasa. Los datos fueron sometidos a análisis estadístico por test-t de Student y varianza F. Resultados. En todas las muestras celulares, el WB mostró el perfil de bandeado propio de la GFAP, mientras que en los cultivos en monocapa paralelamente procesados, la disminución al 30 DIV en el número de astrocitos doblemente marcados coincidió con descenso significativo ($p < 0.001$) en área, perímetro, masa y densidad de PCNA. La aparente recuperación del cultivo al 45 DIV fue simultánea a un transitorio ascenso de los valores para masa y densidad. En cuanto al área ocupada por los núcleos de los astrocitos doblemente marcados, a partir del 2 DIV varió disminuyendo significativamente en cada punto evaluado. Fue al 60 DIV que se registró descenso para todos los parámetros utilizados. Aún cuando hacia el final del período de observación un 22% de astrocitos diferenciados continuaba exhibiendo retención del potencial proliferativo, el comportamiento de los núcleos positivos para PCNA evidenció una significativa restricción de área, perímetro, masa y densidad, la que fue concomitante a la progresión del envejecimiento celular.

207. (7657) NEUROGENESIS ASOCIADA A ENVEJECIMIENTO Y A DIFERENCIAS EN LA CAPACIDAD MNÉSICA EN CHASMAGNATHUS. PESZANO, VALERIA NATACHA; DELORENZI ALEJANDRO; MALDONADO, HECTOR.

LNM, IFIBYNE, FCEN, UBA. 2do piso Pab 2, Ciudad Universitaria

En mamíferos y artrópodos, se ha probado la existencia de neurogénesis en diversas áreas del cerebro, entre ellas aquellas

que se conocen relacionadas a memoria e integración olfatoria. En crustáceos adultos existe neurogénesis en lóbulo olfatorio y en cuerpo hemielipsoide, neuropilo probablemente involucrado en memoria -morfológicamente análogo a los cuerpos pedunculados en insectos y al hipocampo de mamíferos-. Pocos trabajos en vertebrados muestran evidencias experimentales sobre el rol de la neurogénesis en procesos de aprendizaje espacial y contextual. El cangrejo *Chasmagnathus granulata* es ampliamente utilizado como modelo experimental en un paradigma de memoria contextual. Este paradigma está basado en un cambio de estrategia de defensa del animal ante la presentación de un estímulo visual potencialmente peligroso. Se ha observado que la capacidad mnésica varía de individuo a individuo dentro de la población y que el nivel de retención medio decrece con la edad de los individuos. El objetivo primero de este trabajo, es encontrar una correlación entre la edad, la capacidad mnésica individual, y la tasa de neurogénesis de cada individuo. Utilizando técnicas de marcación por incorporación de BrdU in vivo observamos células en división en lóbulo olfatorio, y en cuerpo hemielipsoide. Utilizamos cuatro grupos de animales, categorizados según su edad en jóvenes y viejos, y según su capacidad mnésica en buenos y malos aprendedores, evaluando el nivel de retención individual. Correlacionamos el número de neuronas en división en ambas áreas entre las cuatro categorías. Al comparar el número total de células marcadas entre ambas edades encontramos que la tasa de neurogénesis decrece con la edad ($p < 0.05$), sin embargo, la diferencia respecto a la capacidad mnésica sólo se evidencia en animales jóvenes, donde los animales con mayor retención tienen una mayor tasa de neurogénesis particularmente en el cuerpo hemielipsoide ($p < 0.05$). Los resultados aportan información acerca del rol de la neurogénesis en memoria.

208. (7143) LOS ALFA-CETOÁCIDOS QUE SE ACUMULAN EN EL JARABE DE ARCE INDUCEN ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS C6. FUNCHAL, CLAUDIA; LATINI, ALEXANDRA; JACQUES-SILVA, MARÍA CAROLINE; SANTOS, ANDRÉ; BUZIN, LUCIANE; GOTTFRIED, CARMEN; WAJNER, MOACIR; PESSOA-PUREUR, REGINA

El error innato del metabolismo conocido como Jarabe de Arce (MSUD), se caracteriza clínicamente por severos síntomas neurológicos, edema y atrofia cerebral. Sin embargo, la fisiopatología de tales alteraciones del sistema nervioso central aún no está completamente definida. Por lo tanto, el presente estudio investigó el efecto in vitro de los siguientes alfa-ceto ácidos (BCKA), alfa-ketoisocaproico, alfa-ceto-beta-metilvalérico y alfa-cetoisovalérico sobre varios parámetros de estrés oxidativo con el objetivo de entender mejor los mecanismos que conducen el daño cerebral observado en los pacientes afectados por MSUD. Células de glioma modificadas (C6) fueron incubadas por 3 horas con los BCKA (1, 5 y 10 mM), homogenizadas en tampón fosfato y centrifugadas para descartar núcleos y membranas celulares. El sobrenadante fue utilizado inmediatamente para medir la reactividad antioxidante total (TAR), los niveles de glutatión (GSH), la oxidación de la diclorofluoresceína (DCF) y la producción del óxido nítrico (ON). Los BCKA provocaron una disminución en el contenido de GSH, en el valor del TAR e incrementaron significativamente la producción del ON sin modificar los niveles de oxidación de la DCF. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo podría estar involucrado en los mecanismos que conducen a las severas alteraciones neurológicas observadas en los pacientes afectados con MSUD.

209. (7145) PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES PARA β -GALACTOSIDASA Y GREEN FLUORESCENT PROTEIN TRANSFERIDOS MEDIANTE VECTORES ADENOVIRALES EN EL ENCÉFALO DE RATA. MOREL, GUSTAVO(1); PORTIANSKY, ENRIQUE (2); ZUCCOLILLI, GUSTAVO (3); GOYA, RODOLFO (1)

INIBIOLP-Histología B, FCM. (1) INIBIOLP-Histología B, FCM; (2) Inst. de Patología, FCV; (3) Inst. de Anatomía, FCV, UNLP.

Dos aspectos importantes en la transferencia génica con fines terapéuticos son los niveles de expresión del transgen y la duración de la expresión del mismo. Con el objetivo de aplicar terapia génica en modelos animales de neurodegeneración dopaminérgica senil, se evaluó la efectividad de dos vectores Adenovirales: 1) Ad.nls. β -gal, portador del gen de la β -galactosidasa (β -gal) de *E. coli*; 2) RAd(GFP-TK)fus, portador de un gen para una proteína de fusión entre la green fluorescent protein (GFP) y la timidina kinasa herpética (TK). Se estudiaron los perfiles de expresión in vivo de estos transgenes en sustancia nigra (SN) e hipotálamo (H), así como la expresión de largo plazo de los mismos. Los vectores fueron inoculados estereotáxicamente (10(10) ufp/ml), sacrificando los animales a diferentes días posinyección (pi). Secciones coronales de 40 μ m fueron reveladas por el método de la X-gal y analizadas morfométricamente. A los 2 días pi la distribución rostro-caudal (RC) de la β -gal expresada como superficie tisular relativa (STR) y como frecuencia celular relativa (FCR) mostró una forma acampanada con su máximo en la sección de ingreso de la inyección viral, tanto para SN (STR: 13,41 \pm 0,03; FCR: 223 \pm 5; n=7) como para H (STR: 9,54 \pm 0,03; FCR: 68 \pm 24; n=4). Se observó también que la extensión en el eje RC en SN fue mayor que en H (1,17 \pm 0,17 vs 0,46 \pm 0,001 mm). En el estudio de expresión de largo plazo de la β -gal en SN se observó que a las 3 semanas pi su nivel se mantiene sin cambios, tiempo a partir del cual comienza a disminuir. Por otro lado, el estudio cualitativo del nivel de expresión de largo plazo de GFP en SN e H mostró que a las 4 semanas pi esta proteína es detectable en ambas regiones. Se concluye que estos vectores exhiben una expresión sostenida de sus transgenes por un lapso mínimo de 3 ó 4 semanas resultando, por lo tanto, útiles para su empleo en protocolos terapéuticos experimentales de mediano plazo en SN e H.

210. (7256) PARTICIPACIÓN DE BCL-2 Y DE BAX EN EL DESARROLLO ONTOGENÉTICO POSTNATAL DE LA AMÍGDALA EXTENDIDA CENTRAL

BALASZCZUK, VERÓNICA; PERENO, GERMÁN; BELTRAMINO, CARLOS

Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra-CONICET

La apoptosis es una forma de muerte celular que durante el desarrollo tiene por objetivo eliminar las células que ya no son funcionalmente necesarias a través de la activación de una serie programada de reacciones intracelulares iniciada por productos génicos como Bax (proapoptótico) o inhibida por bcl-2 (antiapoptótico). Se estudió su presencia en el período ontogénico postnatal en la Amígdala Extendida Central (AMExCe) que modulan la función neurovegetativa y la conducta. La AMExCe está compuesta por el Núcleo Amigdalino Central (Ace) y Núcleo Intersticial de la Estría Terminalis (NIET) lateral, unidos por la Estría Terminalis y la Amígdala Extendida Subtenucular (SLEA). Metodología: se usaron ratas machos Wistar normales de edad postnatal (PN) 1, 7, 15 y 20 días. Los cerebros se fijaron y procesaron para inmunohistoquímica (ICC) con el método de doble anticuerpo. Se observaron los cortes en microscopio Axioplan con cámara captadora de imágenes Leica DC 200 y programa KSLite v2.00 para el conteo celular y posterior análisis. Resultados: se detectaron neuronas ICC para bcl-2 y Bax en NIET y Ace. 1) Perfil de ICC en NIET: se observó un aumento de neuronas bcl-2 desde el PN1 (50 células por campo (cpc) al PN7 (180 cpc) decreciendo a los PN15 (48 cpc), aumentando levemente a los PN20 (70 cpc). Para Bax, se observó un perfil diferente, de 80 cpc, en los días 1, 7 y 15, elevándose claramente hacia el día 20 pn (220 cpc). 2) Perfil de ICC en ACE: Bcl2 es fuertemente expresado (aprox. 200 cpc) en 1, 7 y 15 pn, descendiendo a 50 cpc para el día pn20. Bax en cambio, se expresa con muy bajos niveles (40 cpc) en pn1 y 7, subiendo a 55 cpc en pn15 y a 147 cpc en pn20. Conclusiones: ambos factores mediadores de apoptosis, se expresan en el período postnatal temprano (pn1-20) en NIET y la AMExCe de la rata. Se propone que ambos factores se expresan en forma opuesta, necesitando el tejido postnatal primero de

Bcl2 y luego de Bax para modelar la población neuronal definitiva de la AMEx.

211. (7820) ANÁLISIS CONDUCTUAL DE LA RESPUESTA DE DOLOR MUSCULAR EN RATAS TRATADAS CON CAPSAICINA EN EDADES POSTNATALES. HAMITY, MARTA VERÓNICA; LÓPEZ, HÉCTOR

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

En los últimos años se ha puesto central atención en el desarrollo y maduración de las vías nociceptivas y en como la experiencias de dolor tempranas pueden causar cambios en ellas. Muchos de estos trabajos estudiaron el efecto neurotóxico de la Capsaicina sobre nociceptores tipo C. Estos efectos neurotóxicos dependen de la edad y producen cambios en la respuesta conductual de dolor. El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos conductuales de la aplicación intramuscular de Capsaicina debido a que la mayor parte de lo estudiado se realiza en piel. Además se consideró el posible efecto del desarrollo en los resultados conductuales utilizando distintas edades para los tratamientos de Capsaicina. Para este estudio, se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 11 y 15 días de edad, a las cuales se les aplicó una inyección intramuscular de Capsaicina (25 mg/kg, 50 µl) o Salina (50 µl). Posteriormente (día postnatal 60) se evaluó la reactividad al dolor muscular con el test de la Formalina, en el cual se evalúa la frecuencia y duración de conductas de dolor (flinching y tapping) generadas por la aplicación de formalina IM en dos fases: primera o aguda y segunda o inflamatoria. A partir del análisis estadístico de dichas conductas (ANOVA) se encontró que los animales tratados con capsaicina en el día P11 no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles, mientras que los tratados a P15 mostraron mayor respuesta tanto en la conducta de flinching segunda fase ($F=2,10/p<0.428$) como en la de tapping primer fase ($F=2,08/p<0.0658$). Sin embargo en la comparación entre ambas edades no se encontraron diferencias significativas. Si bien la utilización de Capsaicina Intramuscular produjo efectos sobre la reactividad de dolor muscular, difiere de lo reportado para estas edades en la literatura. Sin embargo creemos que estas diferencias pueden deberse a la especificidad de desarrollo y reactividad al dolor propia de cada tejido, pudiendo utilizarse como técnica para estudiar vías nociceptivas musculares.

212. (8085) ALLOPREGNANOLONA IN VITRO ESTIMULA LA LIBERACIÓN DE LHRH HIPOTALÁMICA MODULANDO EL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO/NMDA. GIULIANI, F.(1); ROBY, L.(1); GONZALEZ, J.(1); MOHN, C.(2); RETTORI, V.(2); CABRERA, R.(1)

LINCE-IMBECU-CONICET. FCM. UNCuyo (1). CEFYBO-CONICET (2)

Allopregnanolona (All) es una molécula neuroesteroidea que modula receptores asociados a canales iónicos, como el NMDA y el GABA A. En trabajos previos demostramos que All 120 nM (icv) inhibe la liberación de LH in vivo y este efecto es GABA A dependiente. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de All sobre la liberación in vitro de LHRH y su posible interacción con el sistema excitatorio/NMDA hipotalámico. Se utilizaron ratas hembra ovariectomizadas impregnadas con estrógeno (25µg/rata sc) y progesterona (1mg/rata sc). Para estudiar el efecto de All sobre la liberación de LHRH se usaron cortes de hipotálamo medio basal (HMB) los que fueron incubados con All 6µM. ó vehículo (KRBG) durante 30 min. La LHRH liberada fue medida por RIA. El efecto de All sobre el sistema glutamatérgico fue evaluado mediante la liberación de 3H-Glutámico (3H-Glu) inducida por K+ 28mM de cortes hipotalámicos. Los cortes fueron expuestos a diferentes drogas específicas: All 6µM, AP-7 100µM (antagonista NMDA) solo o combinado con All 6µM, y KRBG libre de Mg2+ (control). La concentración de LHRH se expresó en pg /HMB y se analizó por Test-t. La liberación de 3H-Glu se expresó como % de liberación de 3H-Glu respecto de la liberación

basal y analizada mediante ANOVA1 y Student-Newman-Keuls test. All 6µM estimuló la liberación de LHRH (80±15vs21±6) ($P<0.003$). Paralelamente All 6µM estimuló la liberación de 3H-Glu (112±18vs27±3) ($P<0.001$) respecto del grupo control. La adición al medio de superfusión de AP-7 inhibió el efecto de All (50±9vs112±18) ($P<0.001$). La combinación de AP-7 + All no modificó la reversión observada frente a la presencia de AP-7. El neuroesteroide Allopregnanolona es un potente modulador del sistema excitatorio/NMDA que controla la liberación de LHRH, sugiriéndonos fuertemente que estas moléculas de síntesis endógena neuroglial participan activamente, de forma no genómica, en la regulación de la función neuroendocrina-reproductiva de la rata hembra.

PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS 1: EN PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS

213. (6705) ÓXIDO NÍTRICO EN HÍGADO DE RATAS HEPATECTOMIZADAS TRATADAS CON VITAMINAS ANTIOXIDANTES. RONCO, TERESA; ALVAREZ, LUJAN; QUIROGA, ARIEL; MONTI, JUAN; FRANCÉS, D; PARODY, J.P.; LUGANO, C.; PISANI, G.; CARRILLO, CRISTINA; CARNOVALE, CRISTINA

Instituto de Fisiología Experimental. Fac. de Cs Bioq y Farm. Universidad Nacional de Rosario. Instituto de Fisiología Experimental - CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.UNR

Anteriormente describimos un aumento significativo del nivel de óxido nítrico (NO) y de lipoperoxidación a las 5 horas post-hepatectomía parcial. Objetivo: Analizar el rol del NO en el proceso de regeneración hepática manteniendo disminuido el nivel de lipoperoxidación (LPO). Métodos: Ratas Wistar machos adultos fueron divididas en 3 grupos (n=5 de cada grupo): Control, tratadas con Vitamina E 600mg/kg PC s.c. 24 horas antes de la cirugía (E) y tratadas con Vitamina C 100mg/kg PC 30 minutos antes de la cirugía (C). Cada grupo se subdividió en 2: Sham (cirugía simulada) (Sh) y hepatectomizadas 65% (HP). Las ratas fueron sacrificadas a las 5 y 24 horas post-cirugía. Los resultados se expresan como media ± ESM. El nivel de NO en hígado se determinó por espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR) utilizando dietilditiocarbamato de sodio como atrapador, observándose los siguientes aumentos: Sh: 61,8 ± 8,0 ; HP: 88,1 ± 1,6*; HP-E: 105,7 ± 8,0*#; HP-C: 178,0 ± 9,9*# (* $p<0,05$ vs Sh, # $p<0,05$ vs HP). El nivel de LPO (nmol de malondialdehído /100mg proteína microsomal) aumentó en HP (Sh: 60±6; HP: 112±7*), los tratamientos con Vit-E y Vit-C disminuyeron este aumento respecto a HP control (HP-E: 81±7*, HP-C: 78±6*) (* $p<0.05$ vs HP). El índice de regeneración estimado por incorporación de [(3)H]-timidina al ADN (dpm/mg ADN) mostró los siguientes aumentos: HP 24h: 21050±2100; HP-E 24h: 64903±3200*; HP-C 24h: 31367±1241*, y por detección de PCNA, los índices proliferativos (IP) fueron: HP 24h: 21,4±1,53; HP-E 24h: 36,2±3,5*; HP-C 24h: 32,3±0,5*, * $p<0,05$ vs HP 24h. El tratamiento con vitaminas antioxidantes produce a las 5 hs post-HP una disminución de LPO y un aumento de NO conjuntamente con el incremento del proceso de proliferación. Estos resultados sugieren una participación significativa del NO en la regulación fina del proceso de regeneración hepática.

214. (6860) INDICE APOPTOTICO EN GLANDULAS ADRENALES DE RATAS GESTANTES CRONICAMENTE ESTRESADAS. BOZZO, ANDREA¹; SOÑEZ, CARLOS¹; MUGNAINI, MARÍA¹; PASTORINO, ISABEL¹; ROMANINI, CRISTINA¹; ROLANDO, ALICIA¹; GAUNA, HECTOR F.²

Univ. Nacional de Río Cuarto. Fac. Agr. y Veterinaria y Fac.Ciencias Exactas, F.Q. y Naturales. U.N.R.C.

Bajo la hipótesis que el estrés crónico induce alteraciones sobre la apoptosis en la corteza adrenal de ratas gestantes, los

objetivos fueron cuantificar los núcleos apoptóticos en la segunda mitad de la gestación, y comprobar las características citológicas apoptóticas con microscopía electrónica. Se estudiaron las adrenales de 12^o, 17^o y 21^o días de ratas controles (RC) y estresadas (RE) administrándoles estrés crónico. Con inmunomarcación, análisis estereológico y cuantificación de imágenes se determinaron las variaciones de la apoptosis en las diferentes zonas. Se aplicó ANOVA y test de Kruskal-Wallis. En RC: no se presentaron diferencias significativas en el Índice Apoptótico (IA) entre las zonas de la adrenal, en ninguna de las tres edades. El día de la gestación influyó muy significativamente sobre el IA, aumentando a medida que progresó la gestación. Las diferencias fueron significativas entre los días 12 vs. 17 y 12 vs. 21 ($p < 0.05$). En RE: no hubo diferencias significativas en el IA entre las zonas de la adrenal en ninguna de las tres edades. El día de gestación influyó muy significativamente sobre el IA, aumentando a medida que progresó la gestación. Fueron significativas entre los días 12 vs. 17; 17 vs. 21 y 12 vs. 21 ($p < 0.05$). En la interacción entre los días de gestación y el tratamiento sobre el IA se encontró que en el día 12 hubo una disminución significativa del IA ($p < 0.001$) en RE con respecto a las RC. En el día 17 no se presentaron diferencias significativas en el IA entre RC y RE. En el día 21 se evidenció un aumento significativo del IA ($p < 0.001$) en RE con respecto a las RC. No hubo interacción entre las zonas de la adrenal y el tratamiento sobre el IA. El estrés crónico incrementa el índice apoptótico en la corteza adrenal a medida que progresa la gestación, lo que estaría relacionado a las variaciones previamente comprobadas de prolactina, corticosterona, peso adrenal, y a la disminución de factores de crecimiento específicos.

215. (7114) ACTIVACIÓN PARASIMPÁTICA DE CÉLULAS LMM3 DERIVADAS DE UN ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO. RIMMAUDO, LAURA; DAVEL, LILIA; REARTE, BÁRBARA; SALES, MARÍA ELENA

Area de Investigación, Instituto de Oncología «A. H. Roffo», Facultad de Medicina, UBA.

El Sistema Nervioso Autónomo (SNA) regula diversas patologías como el Síndrome de Sjogren, Enfermedad de Alzheimer y Chagas. Investigamos el papel del SNA parasimpático en el comportamiento biológico de células de la línea LMM3 derivada del adenocarcinoma mamario murino MM3. Caracterizamos la expresión de receptores muscarínicos (RM) en células LMM3 por ensayos de unión específica con el antagonista muscarínico tritido benzilato de quinuclidinilo ([³H]-QNB). Los valores del número máximo de sitios receptores (B_{máx}: fmol/10⁵ cel) y la constante de afinidad (K_d:nM) fueron: 58,3±11,7 y 1,23±0,25 (n=3). Por ensayos de desplazamiento de [³H]-QNB con concentraciones crecientes de los antagonistas (AT), metocramina (MET; selectivo RM2), pirenzepina (PIR; selectivo RM1) y 4-DAMP (selectivo RM3) observamos un orden de potencia que se corresponde con una expresión mayoritaria de RM2 (AT>MET>PIR>4-DAMP). Los RM son funcionales pues el tratamiento de las células con el agonista carbacol (CARB) estimula en forma concentración dependiente la proliferación celular medida por incorporación de [³H]-timidina (% estimulación con respecto al control sin tratamiento). El efecto máximo (55±4; n=5) se redujo por el pretratamiento con una concentración 10(-5) M de AT, MET, PIR y 4-DAMP. El factor de crecimiento del endotelio vascular de tipo A (VEGF-A) es un marcador de neovascularización y como las células LMM3 inducen una potente respuesta angiogénica in vivo (n° vasos/mm² piel; 3,96±0,4 n=6) determinamos la expresión del mismo por Western blot, cuantificando las bandas por densitometría (D.O./mm²). La expresión basal de VEGF-A (0,241) se duplica por el tratamiento de las células con CARB (0,421) y la preincubación con AT (0,213), 4-DAMP (0,295) o MET (0,300) redujo significativamente el efecto del CARB. Concluimos que las células tumorales LMM3 expresan RM funcionales y que la activación de los mismos promovería el crecimiento tumoral al estimular la proliferación celular y la angiogénesis.

216. (7300) CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y ACTIVACIÓN DE SEÑALES INVOLUCRADAS EN LA MUERTE DE CÉLULAS TUMORALES MCF-7C3 EN RESPUESTA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA. RUMIE VITTAR, NATALIA BELÉN; AWRUCH, JOSEFINA; DICELIO, LELIA; STRASSERT, CRISTIAN; RODRÍGUEZ, MIRYAM; RIVAROLA, VIVIANA; OLEINICK, NANCY

Universidad Nacional de Río Cuarto. Univ. de Buenos Aires, Argentina. CWRU School of Medicine, USA CWRU School of Medicine, USA

La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento para el cáncer que se basa en la interacción de la luz con moléculas fotosensibles, las cuales activadas, conducen procesos fotoquímicos y fotobiológicos promoviendo la destrucción de las células tratadas. La TFD es un fuerte inductor de apoptosis, mecanismo que incluye eventos enzimáticos que provocan cambios morfológicos y bioquímicos característicos. Las respuestas a la TFD son dependientes del fotosensibilizador usado, de las condiciones de iluminación y del tipo de células involucradas. Los objetivos de este trabajo fueron investigar: el efecto fotosensibilizador de la ftalocianina Poll, su habilidad para inducir apoptosis y los componentes de dicho mecanismo en respuesta a TFD. El efecto de Poll fue estudiado en células MCF-7c3. Métodos: MTT-clonogénico, citometría de flujo, método enzimático, western blot, Hoechst 33342 La exposición de los cultivos a luz roja (650-675nm) reveló alta eficiencia del fotosensibilizador para inactivar las células (MTT-clonogénico). TFD-Poll indujo contenido subdiploide de ADN (citometría de flujo) y cambios morfológicos nucleares (Hoechst 33342) característicos de una respuesta apoptótica. La cinética de la activación de caspasas (ensayo enzimático-western blot) confirmó que el principal ejecutor de apoptosis, caspasa-3, no fue esencial para la inducción de este tipo de muerte. Luego de TFD-Poll se observó daño lisosomal (LysoTracker Green), activación de Bid pero no de caspasa-8 (western blot) y clivaje atípico de PARP. En correlación con la respuesta apoptótica no se observó activación de p38 ni fotodaño de la proteína antiapoptótica Bcl-2, indicando que no estarían involucradas en este proceso. Los resultados indican que TFD-Poll podría inducir un mecanismo no convencional del proceso apoptótico.

217. (7315) RECEPTORES CON ACTIVIDAD DE TIROSINA QUINASA «ERBBS»: IMPORTANCIA EN LA DIFERENCIACIÓN ADIPOCÍTICA. PAGANO, ELEONORA; CALVO, JUAN CARLOS

Instituto de Biología y Medicina Experimental IByME y Depto. de Química Biológica, FCEyN, UBA

Previamente, demostramos la expresión de erbB-2 en la línea fibroblástica normal murina 3T3-L1, y su modulación durante la adipogénesis inducida con dexametasona (DEXA), isobutilmetilxantina (MIX) e insulina (INS). Así como EGFR, erbB2 disminuye su expresión en células diferenciadas. EGF fosforila en tirosina ambos receptores, estimulando la formación del heterodímero y promoviendo, en ausencia de suero, la proliferación. Dado que las 3T3-L1 también expresan heregulina, un ligando específico para erbB3 y erbB4, por RT-PCR y digestión con enzimas de restricción demostramos solamente la expresión del primero. Confirmamos la expresión de los mensajeros para erbB2 y EGFR. Evaluamos la funcionalidad de estos receptores en la diferenciación adipocítica, bloqueando su función con inhibidores farmacológicos. Las tirfostinas AG 825 y 879 bloquean diferencialmente el erbB2 sobre el EGFR (IC₅₀ (μM) EGFR/erbB2 54.2 y 500, respectivamente). En células proliferantes precursores, AG 825 inhibió significativamente la proliferación con un máximo de un 40% a 100 μM ($p < 0.001$) hasta un 15% a 0,1 μM ($p < 0.01$), mientras que AG 879 produjo una disminución del 20-35% entre 1 μM y 10 μM ($p < 0.001$). En cuanto a la señalización desencadenada luego de inducir la diferenciación, estudiamos la fosforilación de quinasas, ERK, JNK y p38, encontrando

que sólo las dos primeras son activadas en las primeras horas post-inducción (Western blot). Dado que el tratamiento con MIX/DEXA durante la postconfluencia disminuye la expresión de erbB1/EGFR y erbB2, se evaluará la regulación de la expresión de los mismos por ensayos con un gen reportero (luciferasa) bajo el control del promotor en estudio. Los resultados presentados reforzarían la idea de que los erbBs participan en la proliferación y que su modulación negativa sería necesaria para la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1.

218. (7622) LA CERAMIDA ACTUA COMO MEDIADOR EN LA APOPTOSIS DE LOS FOTORRECEPTORES INDUCIDA POR DAÑO OXIDATIVO. ROTSTEIN, NORA; GIROTTI, ROMINA; ABRAHAN, CAROLINA; MIRANDA, GISELA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Bahía Blanca

El aumento en los niveles intracelulares del esfingolípido ceramida activa la apoptosis en diversas situaciones de stress celular. En la retina se desconoce si la ceramida induce la apoptosis de los fotorreceptores. Hemos establecido previamente que tanto el daño oxidativo como el agregado exógeno de ceramida inducen apoptosis en fotorreceptores de retina de rata en cultivo. El objetivo de este trabajo fue investigar si el daño oxidativo podría activar la apoptosis aumentando los niveles endógenos de ceramida. Se agregó fumonisina B1 (FB), un inhibidor de la síntesis de novo de esfingolípidos, a cultivos neuronales de día 0, y se los trató al día 3 con el oxidante paraquat (PQ), por 24 hs. La ceramida puede sintetizarse de novo o por hidrólisis de la esfingomielina; al agregar FB desde el día 0, está bloqueada la síntesis de esfingolípidos y por consiguiente, los niveles de éstos están disminuidos y no puede formarse ceramida por ninguna vía. Este agregado inicial de FB disminuyó notablemente la apoptosis de los fotorreceptores inducida por PQ, de 65% a 28 %, y preservó su funcionalidad mitocondrial respecto a cultivos carentes de FB. Esto sugiere que la ceramida promueve la apoptosis de estas neuronas. Para determinar qué vía participa en la producción de ceramida, se agregó FB al día 3, y 30 min después se añadió PQ, bloqueando así sólo la síntesis de novo de ceramida, y no su formación a partir de esfingomielina. Este agregado tardío de FB protegió a los fotorreceptores, pero no a las neuronas amacrinadas, de la apoptosis inducida por PQ. Estos resultados permiten proponer que el stress oxidativo induciría la síntesis de novo de ceramida, que actuaría como un mediador esencial para activar la apoptosis en los fotorreceptores. A su vez, sugieren que la modulación de los niveles endógenos de ceramida podría proporcionar una herramienta terapéutica para prevenir la muerte de estas neuronas en enfermedades neurodegenerativas de la retina.

219. (7632) LA ESTEAROIL-COA DESATURASA (SCD) CONTROLA LA PROLIFERACIÓN, EL CRECIMIENTO INDEPENDIENTE DE ANCLAJE Y LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN CÉLULAS HUMANAS TRANSFORMADAS. NATALIA, SCAGLIA; IGAL, R. ARIEL

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Fac. Cs. Médicas UNLP

Los ácidos grasos saturados (SFA) y monoinsaturados (MUFA) son los principales bloques estructurales de los lípidos de membrana y de depósito en células de mamíferos y su distribución es regulada por la estearoil-CoA desaturasa (SCD), enzima que convierte SFA en MUFA. Debido a que niveles elevados de MUFA se relacionan a la transformación neoplásica, estudiamos la regulación del metabolismo lipídico, la proliferación y muerte celular programada en las células humanas transformadas SV40-WI38 sometidas al knockdown estable del gen de SCD mediante la transfección con cDNA antisense (células hSCDAs) o con vector vacío (células controles). Las células hSCDAs exhibieron una reducción de ~70% en la síntesis de MUFA, así como una disminución del 33% en la formación de fosfolípidos, respecto de los controles. Interesantemente, la incorporación de [(14)C]ácido oleico en fosfolípidos de células hSCDAs aumentó

23%, indicando un mayor recambio de MUFA en las membranas celulares. Por otra parte, la tasa de proliferación de las células hSCDAs, evaluada mediante la síntesis de DNA y curvas de crecimiento, se redujo a valores semejantes a los de fibroblastos humanos normales WI38. La exposición a ácido oleico exógeno durante 72 hs no revirtió la menor proliferación de las células deficientes en SCD, sugiriendo que la síntesis endógena de MUFA es esencial para la replicación celular. Por otra parte, la depleción de SCD en las células SV40 suprimió el crecimiento celular independiente de anclaje. Finalmente, la tasa de apoptosis se incrementó ~70% en las células hSCDAs, siendo este evento independiente de la participación de las ceramidas y resistente al agregado de ácido oleico exógeno. Estos estudios sugieren que SCD es esencial para la proliferación y supervivencia celular y enfatiza el rol trascendente de la síntesis de MUFA sobre la homeostasis lipídica. Adicionalmente, la expresión de SCD parece ser relevante para sustentar el fenotipo neoplásico de las células transformadas.

220. (7886) SOBREENPRESIÓN DE iNOS Y NITRACION DE PROTEÍNAS EN PULMON CON DEFICIENCIA MODERADA DE ZINC. GÓMEZ, NIDIA; BIAGGIO, VERÓNICA; ALVAREZ, SILVINA; FISCHER (1), PATRICIA; MASNATTA (1), LUCAS; GIMÉNEZ, MARIA

UNSL. Fac. de Qca, Bioquímica. y Fcia, UNSL (San Luis); (1) Univ. Favaloro, (Bs.As.)

Introducción: Trabajos previos en nuestro laboratorio demostraron la presencia de nitritos + nitratos aumentados, aumento de la actividad de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y un estado inflamatorio con infiltración importante de polimorfonucleares en pulmón, como consecuencia de una deficiencia moderada de Zinc (ZD). Materiales y Métodos: El objetivo de nuestro estudio fue corroborar si aumentaban los niveles de ARNm de iNOS en pulmón y la expresión de la misma en macrófagos alveolares, determinar que células pulmonares están comprometidas en la producción de iNOS y detectar proteínas nitradas como un indicador de actividad oxidativa. Se utilizaron ratas Wistar macho de 200 ± 20 g de peso, separados 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) con 5mg de Zn/Kg de dieta. Las proteínas de macrófagos se separaron en gel SDS-PAGE 8% y se identificaron por Western Blot. El RNA total se obtuvo por el método de Trizol y los niveles de ARNm para iNOS por RT-PCR. Las células comprometidas se detectaron por inmunohistoquímica (Koara y col 2002) y la nitración de proteínas según (Vaziri y col, 2000). Las bandas se cuantificaron por densitometría. Resultados: La expresión de iNOS en macrófagos presentó un importante aumento con un (p<0.01) y la abundancia de ARNm de iNOS en pulmón fue significativamente mayor en ZD con un (p<0.01). La expresión de iNOS se detectó principalmente en los polimorfonucleares infiltrados, en el árbol respiratorio, con escasa marca en el epitelio alveolar. Los peroxinitritos fueron más abundantes en ZD, aunque no presentaron una diferencia significativa. Concluimos que la actividad de iNOS en pulmón con una deficiencia moderada de Zinc conduce a la nitración de proteínas, lo que se correlaciona principalmente con la infiltración de polimorfonucleares en pulmón.

221. (7906) CASCADA DE FOSFORILACION EN LA MUERTE CELULAR APOPTOTICA INDUCIDA POR STRESS OXIDATIVO EN ASTROCITOS. KOTLER, MÓNICA; ARMANINO, MARIA; GONZÁLEZ, LAURA; JUKNAT, ADELA ANA

Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA

Las MAPKs son serina/treonina quinasas involucradas en respuestas celulares a diferentes estímulos. ERK 1/2 se activa principalmente por factores de crecimiento y está involucrada en la progresión del ciclo celular y en la proliferación. Las citoquinas inflamatorias y el stress oxidativo estimulan preferencialmente las actividades de JNK y p38, implicadas en el arresto del ciclo ce-

lular y la apoptosis. El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar las quinasas involucradas en la apoptosis inducida por H_2O_2 en astrocitos, su rol en el destino celular (vida/muerte) y el efecto de antioxidantes sobre su expresión. Empleando Western Blots se observó un aumento en la fosforilación de las tres quinasas en presencia de H_2O_2 500 μ M, que resultó máxima a los 30 min. El análisis de la viabilidad celular y conteo de núcleos apoptóticos teñidos con el colorante Hoechst 33258 reveló que la vía de p38 desencadena la apoptosis. Se estudió la prevención de la activación de MAPKs por parte de los antioxidantes GSH, NAC y melatonina (MLT). La preincubación con NAC (10mM) y GSH (0,5mM) previno la activación inducida por H_2O_2 (500 μ M, 30min) de las tres MAPKs, con excepción de GSH que no tuvo efecto sobre la activación de p38. En todos los casos NAC demostró ser más eficiente que GSH. La MLT 0,1 mM, 1,0 mM y 2,0 mM no fue efectiva en prevenir la activación de MAPKs. No obstante, MEL 0,1 mM se ha encontrado que previene la apoptosis, disminuyendo en un 33% ($p < 0,05$) los niveles de expresión de Fas-L, proteína involucrada en la cascada apoptótica. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento de las posibles estrategias a emplear para mitigar el daño celular inducido por radicales libres en las enfermedades neurodegenerativas y revelan la posibilidad de una doble intervención: por una parte, el clásico tratamiento con antioxidantes y por otra, la perspectiva del empleo de inhibidores de las vías de MAPKs, en nuestro caso, inhibidores de p38.

222a. (7907) EL ACIDO DOCOSAHEXAENOICO PREVIENE LA APOPTOSIS DE LOS FOTORRECEPTORES DISMINUYENDO LOS NIVELES DE CERAMIDA. GIROTTI, ROMINA; MIRANDA, GISELA; ABRAHAN, CAROLINA; ROTSTEIN, NORA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Bahía Blanca

Las neuronas fotorreceptoras mueren por apoptosis en enfermedades neurodegenerativas de la retina, pero aún se desconocen los mecanismos que activan esta muerte. Recientemente determinamos que tanto el daño oxidativo como el agregado de ceramida, esfingolípido cuyo aumento dispara la apoptosis en múltiples sistemas biológicos, inducen apoptosis en fotorreceptores de retina de rata. Demostramos también que el ácido docosahexaenoico (DHA), ácido graso mayoritario en este tejido, previene la apoptosis, promoviendo la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, y preservando la funcionalidad mitocondrial. El DHA aumenta la transcripción de numerosos genes, entre ellos el de la glucosilceramida sintetasa. Nos propusimos investigar si esta enzima que glucosila a la ceramida, disminuyendo así sus niveles endógenos, participa del efecto protector del DHA. Cultivos de neuronas de retina de rata, con o sin DHA, se trataron con PPMP, un inhibidor de la glucosilceramida sintetasa y luego con C2-ceramida (C2-Cer), un análogo de las ceramidas naturales. El inhibidor bloqueó el efecto protector del DHA: cuando se agregó C2-Cer, el porcentaje de fotorreceptores apoptóticos en cultivos con DHA y PPMP fue igual al de cultivos sin DHA. Para investigar si la glucosilceramida sintetasa está involucrada en el efecto protector del DHA frente al daño oxidativo, cultivos suplementados con DHA se trataron con PPMP y luego con el oxidante paraquat. En estos cultivos, el PPMP suprimió el efecto antiapoptótico del DHA frente al daño oxidativo. Estos resultados confirman que el aumento en los niveles endógenos de ceramida participa de la inducción de apoptosis por daño oxidativo (ver Rotstein y col.). Sugieren también que el DHA activaría diversos mecanismos para evitar la apoptosis de los fotorreceptores: además de estimular la expresión de Bcl-2, aumentaría la glucosilación de la ceramida, promoviendo su desaparición y evitando así un aumento en sus niveles intracelulares que active la apoptosis.

222b. EFECTOS APOPTÓTICOS DEL HCB Y ACCIÓN DE ANTIOXIDANTES. MOLINA CAMPOS, ELIZABETH; RÍOS DE MOLINA, MARÍA DEL CARMEN

Lab. Estrés y Estudios Metabólicos; Fac. Ciencias Exactas y Naturales; Dpto. Química Biológica, Univ

Estudiando el efecto del Hexaclorobenceno (HCB; un Contaminante Orgánico Persistente) sobre la línea de Hepatoma Humano Hep2, probamos la participación del estrés oxidativo en su mecanismo de acción (SAIC 2003). El objetivo del presente trabajo es comprobar el desencadenamiento de apoptosis por acción del HCB sobre estos cultivos celulares y su prevención por antioxidantes. Se midió actividad Superóxido dismutasa (SOD), como medida de defensa antioxidante endógena, se analizó por la técnica de tinción con Naranja de acridina (NA) la presencia de células apoptóticas y se midió el porcentaje de supervivencia utilizando el colorante de exclusión Trypan Blue. El HCB (1,75 ó 3,5 μ M) se agregó al medio de cultivo, dejándolo actuar durante 24 ó 48 hs. Para la prevención de apoptosis se trabajó con los antioxidantes Tioctamida (TO) 70 mg/ml y Vitamina C 1 mg/ml, aplicados desde el tiempo cero. El HCB provocó un aumento de 1,6-1,7 veces en la actividad SOD (control $4,44 \pm 0,15$ U/mg prot) ($p < 0,05$) a las 24 hs de tratamiento, cayendo ligeramente a las 48 hs. Ninguno de los antioxidantes aplicados produjo variaciones significativas en esta actividad, bajo las distintas condiciones de cultivo ensayadas. A las dos dosis empleadas, se vio un descenso del 30% en el grado de supervivencia recién a las 48 hs de tratamiento con HCB. Un análisis preliminar cualitativo, de los ensayos con NA, permitió detectar apoptosis insipiente en los ensayos con HCB 1,75 μ M (núcleos refringentes, verde intenso) tendiendo a franca apoptosis en los ensayos de 48 hs (aparición de núcleos rojizos). La TO provocó una aparente protección de las células tratadas con sendas drogas durante 48 hs, no afectando a los cultivos control. Conclusiones: Los resultados obtenidos sugieren que el HCB puede inducir apoptosis en células Hep2. Este proceso es parcialmente prevenido por un aumento de la actividad SOD (defensa antioxidante endógena) o proviniendo un antioxidante como protector exógeno. La protección alcanzada es sólo parcial, muy posiblemente debido a que la acción del HCB es un proceso multifactorial.

**PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS 2:
MECANISMOS MOLECULARES**

223. (6839) ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-8 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LOS INHIBIDORES DE TRISPINA DE LA SOJA Y DE PELTOPHORUM DUBIUM EN CÉLULAS JURKAT DE LEUCEMIA HUMANA. TRONCOSO, MARÍA FERNANDA; LONGHI, SILVIA A; YOSHIZAKI, LUCILA; RETEGUI, LILIA A; WOLFENSTEIN-TODEL, CARLOTA

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA

La apoptosis puede ser inducida por la vía intrínseca mitocondrial o por «receptores de muerte». Previamente demostramos que los inhibidores de tripsina de la soja (SBTI) y de la leguminosa Peltophorum dubium (PDTI) inducen apoptosis de las células Nb2 de linfoma de rata y de las células Jurkat de leucemia humana (SAIB 2003). El objetivo del presente trabajo fue examinar el mecanismo molecular de dicha apoptosis. Para ello se determinó el incremento de las actividades de las caspasas-3 y -8 causado por incubación de las células Jurkat con PDTI o SBTI 25 μ M, utilizando un método fluorométrico. La actividad de caspasa-3 luego de 6 hs aumentó de $9,7 \pm 0,3$ unidades de fluorescencia relativa para el control a $44,2 \pm 5,2$ ($p < 0,001$) unidades en presencia de SBTI mientras que PDTI causó un incremento menor, llegando a $29,5 \pm 2,5$ ($p < 0,001$) unidades. En cambio, la actividad de caspasa-8 aumentó de $1,3 \pm 0,7$ unidades de fluorescencia relativa a $6,7 \pm 1,5$ y $6,9 \pm 0,3$ ($p < 0,001$) unidades en presencia de SBTI y PDTI respectivamente. Para determinar cambios en el potencial de la membrana mitocondrial se utilizó el fluorocromo catiónico DiOC[6](3) y se observó que luego de 3 hs ambos inhibidores producían un leve descenso de dicho potencial (13 ± 4 y $16 \pm 5\%$ respectivamente), sin mayor descenso luego de 6 ó 18 hs de incubación. Sin embargo no se detectó, por Western blot, un aumento significativo del citocromo

c citosólico después de 3, 4, 6, 18 ó 24 hs de tratamiento. Para comprobar si este efecto es específico del PDTI y del SBTI, se ensayó otro inhibidor, también de tipo Kunitz, aislado de *Pterogyne nitens*, el que no disminuyó la viabilidad de estas células. Los resultados sugieren que estos inhibidores activan a la caspasa iniciadora de tipo-8 (vía mediada por receptor) y que la vía intrínseca mitocondrial no sería la predominante en este proceso apoptótico.

224. (6857) MECANISMOS DE CONTROL DE LA EXPRESIÓN DEL GEN BCL-X EN LA DIFERENCIACIÓN E INVOLUCIÓN DEL EPITELIO MAMARIO. ROCHA VIEGAS, LUCIANA (1); QUAGLINO, ANA (2); BEATO, MIGUEL (3); KORDON, EDITH (2); PECCI, ADALI (1)

(1) *Química Biológica y FBMC FCEN-UBA.* (2) *ILEX-CONICET, IHEMA, Acad. Nac. Medicina;* (3) *CRG, Barcelona, España.*

La expresión de bcl-X, involucrado en apoptosis, depende de la actividad de 5 promotores que generan isoformas con funciones opuestas: Bcl-XL (antiapoptótica) y Bcl-XC (proapoptótica). Hemos demostrado que en tejidos donde los glucocorticoides previenen la apoptosis, inducen bcl-XL por interacción del complejo hormona-receptor con dos elementos de respuesta específicos presentes en el promotor 4 (P4). En forma opuesta y coherente con su acción inductora de apoptosis en timocitos, los glucocorticoides inhiben la expresión de bcl-XL a través de la unión de STAT 5B a P4. Es sabido que durante la involución del epitelio mamario disminuye la relación bcl-XL/bcl-XC. El objetivo del trabajo fue determinar el mecanismo de regulación de P4 en dicho tejido y su influencia en la expresión de bcl-XL. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) mostraron la unión del receptor de glucocorticoides (GR) y STAT 5A a P4 durante la lactancia, mientras que en involución sólo se reclutó STAT 5B. Con el objeto de estudiar esta diferencia, se determinó por ChIP la unión de los distintos factores a P4 en cultivo de células mamarias (HC11) en estadios de proliferación y diferenciación bajo el control de dexametasona (DEX) y/o prolactina (PRL). Los resultados mostraron que DEX estimula el reclutamiento de GR y de la RNA pol II en células proliferando y aumenta los niveles de bcl-XL (2.8±0.2 veces vs control). Sin embargo, en células diferenciadas, estimula sólo la unión de STAT 5B. La adición de PRL a células diferenciadas tratadas con DEX bloquea la unión de STAT 5B y permite que GR, la RNA pol II y STAT 5A, se recluten a P4. En su conjunto, los resultados sugieren una función diferencial de ambos factores STAT 5 en la modulación de la expresión de bcl-X mediada por glucocorticoides. Los glucocorticoides inhibirían la expresión del gen mediante la activación de STAT 5B, pero en presencia de PRL, la inducirían por acción directa conjuntamente con STAT 5A activado.

225. (6876) MECANISMOS ANTIAPOPTÓTICOS DE LA ERITROPOYETINA EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO. PREGI, NICOLÁS; VITTORI, DANIELA; PÉREZ, GLADYS; PÉREZ LEIRÓS, CLAUDIA; NESSE, ALCIRA

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

Un porcentaje importante de la población mundial se ve afectada por enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer y Parkinson. La neuroprotección, como una forma de proteger a las células del sistema nervioso de la muerte celular programada, es un concepto nuevo y representa un enfoque distinto a nivel terapéutico. El rol biológico de la eritropoyetina (Epo), antes limitado a la regulación de la proliferación y diferenciación de progenitores eritroides, actualmente se ha expandido. El objetivo de este trabajo fue la investigación de mecanismos que median la actividad antiapoptótica de Epo sobre células neuronales. Se empleó la línea celular de neuroblastoma humano indiferenciado SH-SY5Y inducida a apoptosis con staurosporina (12 h). El efecto de Epo se ensayó por tratamiento previo de 2 h con 25 U/ml. La apoptosis fue evaluada por electroforesis (ladder) y por

identificación de células apoptóticas (Hoechst). Se determinó la expresión de receptor de Epo (EpoR) y de factores de la familia bcl-2 a nivel de mRNA (RT-PCR) y de proteína (Western blot). El tratamiento con staurosporina (10-100 nM) mostró un efecto apoptótico concentración-respuesta. La staurosporina 25 nM indujo 34% de células apoptóticas, efecto totalmente revertido ($P < 0,05$) por el pretratamiento con Epo (valores similares a la apoptosis espontánea). Los cambios morfológicos inducidos por staurosporina (crecimiento, elongación e interconexión de neuritas) fueron inhibidos por Epo. La expresión de EpoR y factores de la familia de bcl-2 se encontró modulada por la hormona. Los cultivos realizados en presencia de wortmanina, inhibidor de PI3K, demostraron que el efecto antiapoptótico de Epo era mediado, en gran parte, por la activación de esta vía. La Epo presenta una acción preventiva de la apoptosis inducida por staurosporina en células de neuroblastoma. El efecto es mediado por la activación de la transcripción de genes de la familia de bcl-2 e involucra, preferencialmente, la activación de la vía de PI3K.

226. (6957) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES EN TIMOCITOS DE RATÓN. PRESMAN, DIEGO M (1); HOIJMAN, ESTEBAN (1); CEBALLOS, NORA R. (2); PECCI, ADALI (1)

(1) *Dpto. Química Biológica, FCEN-UBA* (2) *Dpto. Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN-UBA*

En trabajos previos demostramos que la melatonina (MEL) antagoniza la inducción de apoptosis mediada por dexametasona (DEX) en cultivos primarios de timocitos de ratón. Este efecto sería a través de la inhibición de la inducción de la expresión del gen bax por glucocorticoides. Si bien se han descrito caminos de señalización activados por MEL, poco se sabe acerca de los mecanismos involucrados en el antagonismo MEL/DEX. Con ese fin se analizó el efecto de DEX (10 nM) en presencia o ausencia de MEL (10 nM) sobre la capacidad del receptor de glucocorticoides (GR) de translocar a núcleo en cultivos primarios de timocitos de ratón. Tanto el ensayo de inmunofluorescencia con microscopía confocal como el fraccionamiento subcelular analizado por Western blot demostraron que DEX induce la translocación del GR del citoplasma al núcleo. Este efecto es bloqueado por MEL, que per se no modificó la distribución subcelular del GR. Para evaluar si MEL inhibe en forma general la acción del GR, se realizaron co-transfecciones independientes, en células Cos-7, de dos vectores reporteros que responden de forma directa a glucocorticoides (MMTV-luc y BclXP4-Luc) con un vector de expresión que codifica el GR. Las células fueron tratadas con DEX y/o MEL. Los resultados indican que mientras DEX induce la expresión de luciferasa de ambos reporteros (MMTV-Luc= 20.2 veces y BclX-P4-Luc= 1.8 veces), la presencia de MEL no afectó estos parámetros (MMTV-Luc= 18.2 veces y BclX-P4-Luc= 2.1 veces). Estos resultados sugieren que MEL no tendría una acción directa sobre el GR. Con el fin de evaluar esta hipótesis, se realizaron ensayos de interacción hormona/receptor, en presencia o ausencia de MEL, que demostraron que el metoixindol no desplazó significativamente la unión específica de [3H]-DEX en preparaciones postmitocondriales de timocitos. Los resultados sugieren que MEL inhibe la translocación de GR mediada por DEX mediante un mecanismo que no involucraría su acción directa sobre el GR.

227. (6984) EXPRESIÓN ECTÓPICA DE E2F INDUCE LA EXPRESIÓN DE P19INK4D, INHIBIDOR ESPECÍFICO DE CDK4/6, EN TODAS LAS FASES DEL CICLO CELULAR. CARCAGNO, ABEL; SCASSA, MARÍA; CERUTI, JULIETA; CÁNEPA, EDUARDO

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

La proteína p19 es uno de los cuatro miembros de la familia de inhibidores de CDK4/6 denominada INK4. Hipótesis recientes postulan que cada uno de ellos estaría involucrado en dife-

rentes funciones celulares debido, en parte, a diferencias en la regulación transcripcional manifestándose en una expresión específica ante diversos estímulos. Si bien la regulación de p16 y p15 ha sido caracterizada, la de p18 y p19 no ha sido aún dilucidada. Llamativamente, p19 presenta una expresión periódica a lo largo del ciclo celular. El objetivo consiste en estudiar la regulación de la expresión de p19 y determinar las causas de su periodicidad. El sistema utilizado consistió en cultivos de fibroblastos BHK21, cuyo ciclo, determinado por FACS, tiene una duración de 18-20 h. Mediante ensayos de northern y western, se confirmó la periodicidad de p19 con una ventana de expresión entre G1 medio y final de S. Las células fueron transfectadas con vectores que expresan los factores E2F (1 a 6). La sobreexpresión de E2F1, 2 y 3 produjo un aumento del mRNA de p19, mientras que las isoformas E2F4, 5 y 6 no tuvieron efecto. Cuando las células fueron sincronizadas y arrestadas en las distintas fases del ciclo, la sobreexpresión de E2F1 incrementó la transcripción de p19 aún en aquellas fases del ciclo donde normalmente no se expresa (G2 y M) y en quiescencia (G0). El análisis *in silico* del promotor de p19 muestra sitios de unión potenciales para varios factores de transcripción, entre ellos 4 sitios para E2F. Oligonucleótidos (dON) para estos 4 sitios fueron utilizados en ensayos de EMSA con extractos nucleares de BHK. Dos de ellos formaron un complejo DNA-proteína idéntico al formado con un dON conteniendo el sitio consenso para E2F. Estos complejos resultaron mutuamente competidos con exceso de dON frío. Los resultados presentados demuestran la participación de E2F en la regulación del gen de p19INK4d y sugieren que la disponibilidad de estos factores podría determinar la periodicidad de su expresión.

228. (7350) EFECTOS OSTEOGÉNICOS DE UN COMPLEJO DE VANADIO(IV) CON ASCÓRBICO (VOASC). CORTIZO, ANA MARÍA; BARRIO, DANIEL A

Bioquímica Patológica, Fac Cs Exactas, UNLP

El complejo de vanadio con ácido ascórbico se identificó como un compuesto endógeno excretado en la orina de individuos con sobrecarga salina, con propiedades inhibidoras de la Na-K-ATPasa. Dado que el vanadio se acumula en el hueso, nos propusimos investigar los efectos de este complejo sobre células osteoblásticas. El VOAsc sintetizó y caracterizó (IR y UV-vis). Se usaron células UMR106, derivada de un osteosarcoma de rata, y MC3T3E1, derivada de calvaria de ratón. Se analizó la proliferación celular (bioensayo del cristal violeta), diferenciación (fosfatasa alcalina (FA), producción de colágeno) y mineralización (formación de nódulos). VOAsc a bajas dosis (2,5-25uM) estimuló la proliferación en UMR106 (120-140% basal, $p < 0.01$), mientras que inhibió el crecimiento celular por encima de 75uM (10-20% inhibición, $p < 0.05-0.001$). En la línea MC3T3E1, VOAsc (25-100uM) inhibió la proliferación (8-30% inhibición, $p < 0.05-0.001$). VOAsc (10-100uM) inhibió la FA (20-25% inhibición, $p < 0.05-0.01$), después de 24 h de incubación. En la línea MC3T3E1, también se observó una inhibición de FA (30-40% inhibición, $p < 0.01$) después de 1-3 semanas de cultivo. Sin embargo, VOAsc (5-100uM) estimuló la acumulación de colágeno tipol al cabo de 48 h de incubación en ambas líneas celulares, en una forma dependiente de la dosis (110-150% basal, $p < 0.05-0.001$). Este efecto fue acompañado en las células MC3T3E1, por un aumento en los nódulos de mineralización (4 semanas de cultivo) con 10uM VOAsc. Los efectos del VOAsc sobre la producción de colágeno, fueron parcialmente revertidos en presencia de Nifedipina (inhibidor de canales de Ca-L-voltaje dependiente), un inhibidor de Erk (PD98059) y de PI-3-K (wortmanina). Esto sugiere que este compuesto podría actuar aumentando el Ca intracelular y a través de la vía de fosforilación de MAPKinasas. En conclusión, bajas dosis de este complejo muestran propiedades osteogénicas en el modelo de osteoblastos en cultivo, sugiriendo su posible aplicación en la reparación del tejido óseo.

229. (7361) APOPTOSIS, PROLIFERACION Y EXPRESION DE EPO(R), BCL-XL/BAX EN MEDULA OSEA POST TRATA-

MIENTO CON CICLOFOSFAMIDA. JUARISTI, JULIÁN; AGUIRRE, MARÍA; TODARO, JUAN; ALVAREZ, MIRTA; ESPADA, TRACY; BRANDAN, NORA

Catedra De Bioquímica.Facultad De Medicina. Universidad Nacional Del Nordeste.Corrientes.Argentina.

La injuria por citotóxicos implica muerte celular por necrosis y/o apoptosis (muerte celular programada). En este último proceso, cumplen un papel central las proteínas de la familia Bcl 2. Mientras algunos miembros bloquean la apoptosis (Bcl-x[L]), otros la activan (Bax). En la hematopoyesis, Bcl-x[L] está particularmente implicada en la sobrevivencia del compartimento eritroideo. Se correlacionaron: celularidad, apoptosis, respuesta proliferativa a Eritropoyetina (EPO) y las expresiones de Bcl-xL/Bax; Epo-R en médula ósea (MO) murina tras una dosis de Ciclofosfamida (CPA) (200 mg/Kg). A las 0, 6, 12, 24, 72, 96 y 120 hs se determinaron celularidad, % de apoptosis (ensayo TUNEL), índices de proliferación (incorporación de (3)HT) y se obtuvieron lisados para inmunoblottings. CPA produce una caída en la celularidad de MO, alcanzando el 13% a las 48 hs ($P < 0.01$), afectando particularmente el compartimento eritroideo. La expresión de Bax descende hasta las 48 hs al 28% vs control, persistiendo hasta las 96 hs, retornando a valores basales a las 120 hs. La expresión de Bcl-x[L] cae desde las 6 hs incrementándose gradualmente hasta el máximo de su expresión a las 48 hs (3 veces el valor basal) y descendiendo hacia el final de la experiencia. La expresión de ambas proteínas muestra correlación inversa. A las 48 hs coinciden la máxima expresión de Bcl-x[L], con mínima expresión de Bax, máxima apoptosis y mínima celularidad. La expresión de Epo-R no muestra cambios significativos hasta las 120 hs, cuando su valor se incrementa 10 veces sobre el control ($P > 0.01$), coincidiendo con la máxima respuesta proliferativa a Epo. Estos resultados sugieren que en MO, las células eritroideas que sobreviven a la injuria post-citotóxica lo logran por sobreexpresión de Bcl-x[L]. La posterior expresión de EPO-R determinaría el comienzo de la expansión y proliferación del compartimento eritroide.

230. (7648) MECANISMOS MOLECULARES POR LOS CUALES NF-KB, EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS, LA CICLINA D1 Y EL COACTIVADOR RAC3 CONTROLAN LA PROLIFERACIÓN CELULAR. RUBIO, MA. FERNANDA (1); WERBAJH, SANTIAGO(2); COLÓ, GEORGINA P.(1); NOJEK, IGNACIO M.(1); COSTAS, MÓNICA A.(1)

Instituto de Investigaciones Medicas A. Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari UBA-CONICET 'Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari UBA-CONICET 'Instituto Leloir

RAC3, uno de los miembros de la familia de coactivadores p160, se encuentra sobre expresado en ciertos tumores mamarios. Hemos demostrado previamente, que esta molécula es un coactivador del factor NF-kB y contribuye a la proliferación de la línea tumoral mamaria de ducto T47-D, ER positiva, en respuesta a la estimulación con la citoquina TNF-alfa y 17beta-estradiol a través de la formación de un complejo ternario conteniendo ER/NF-kB y el coactivador RAC3. Este complejo se une al promotor del gen de la Ciclina D1 en los elementos respondedores a NF-kB induciendo su expresión. Se ha demostrado previamente que la sobreexpresión de RAC3 no sólo disminuye la sensibilidad a apoptosis, sino que aumenta el volumen celular contribuyendo a la mitosis. Existen evidencias de que la Ciclina D1 es capaz de reclutar complejos conteniendo coactivadores y receptores nucleares. Dado que NF-kB interacciona con los mismos coactivadores que los receptores nucleares y siendo la Ciclina D1 un gen blanco de este factor, se quiso determinar si existen complejos similares conteniendo a NF-kB. En células HEK293 (no respondedoras a estrógenos), T47-D y MCF7 (tumoraes mamarías respondedoras a estrógenos) se determinó la posible interacción física entre la Ciclina D1, NF-kB y RAC3 a través de ensayos de co-inmunoprecipitación, Western blot e inmunofluorescencia. Observamos que existe una interacción física entre la Ciclina D1, RAC3 y Rel-A (uno de los miembros de

la familia NF- κ B). La formación de estos complejos podría estar relacionada a la actividad proliferativa de RAC3 y la expresión de genes blanco de NF- κ B necesarios para la progresión del ciclo celular, tanto en células de crecimiento hormono-dependiente como independiente.

231. (7834) EFECTO BIFÁSICO DE LA GALECTINA-1 SOBRE LA LÍNEA TUMORAL DE LEYDIG MA-10: MODULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y ADHESIÓN CELULAR. BIRON, V.; PATRIGNANI, Z.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; PIGNATARO, O.; IGLESIAS, MM

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Lab. de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales. IByME-CONICET

La galectina-1 (Gal-1) pertenece a una familia de proteínas con afinidad por β galactósidos, presente en células normales y tumorales, ejerciendo control sobre el ciclo celular y programa apoptótico. Hemos demostrado que la Gal-1 (400 μ g/ml) en cultivos de células de Leydig y en la línea tumoral Leydig MA-10 (cLMA-10) disminuye la viabilidad y la funcionalidad celular. Objetivos: Determinar las vías de apoptosis mediadas por Gal-1, evaluar el efecto de esta proteína a menores dosis y determinar la presencia de galectinas en la cLMA-10. Métodos y resultados: Se determinó la viabilidad celular en presencia de Gal-1 400 μ g/ml a diferentes tiempos siendo significativa su disminución a partir de las 12 hs de incubación (88.6 \pm 1.2%, 12 hs, $p < 0.01$; 65.0 \pm 5.9%, 24 hs, $p < 0.001$). Para determinar el mecanismo mediante el cual Gal-1 ejerce su efecto apoptótico se midió a) la actividad de caspasa-8 por método fluorométrico, b) el potencial de membrana mitocondrial mediante el fluorocromo DiOC₆, y c) el contenido citosólico de citocromo c por WB. Luego de la incubación con Gal-1 se detectó un aumento de la actividad de caspasa-8 (154.1 \pm 16.6%, $p < 0.05$), un incremento en el número de células con pérdida del potencial de membrana mitocondrial (13.6 \pm 1.7 vs 70.2 \pm 0.71%, 6 hs, $p < 0.01$) y la liberación de citocromo c al citosol (137%, 6 hs, $p < 0.01$). Por otro lado, se obtuvo un aumento de viabilidad cuando se sometieron a las células a Gal-1 0.25 μ g/ml (126.3 \pm 2.4%, 24 hs, $p < 0.01$). Además Gal-1 fue capaz de aumentar la adhesión de estas células cuando se adhirió Gal-1 a la fase sólida (141.5 \pm 12.9%, 3 hs, 1 μ g/well, $p < 0.001$). Finalmente, se purificaron Gal-1 y Gal-3 de un extracto celular utilizando una columna de agarosa-lactosa. Conclusiones: La presencia de Gal-1 y el efecto bifásico detectado sugiere un posible rol de Gal-1 como factor modulador del crecimiento y adhesión en la cLMA-10. La expresión de Gal-1 y Gal-3 podría jugar un rol en la regulación de las funciones celulares.

232. (8061) CÉLULAS persistentemente infectadas con HIV-1: SENSIBILIDAD FRENTE A INDUCTORES EXTERNOS DE APOPTOSIS. FERNÁNDEZ LARROSA, PABLO NICOLÁS (1); RIVA, DIEGO (2); MERSICH, SUSANA E (2); MARTÍNEZ PERALTA, LILIANA (1)

CNRS, Depto. Microbiología, Fac. Medicina, UBA. (1) CNRS, Depto. Microbiol., Fac. Med., UBA; (2) Lab. Virología, Depto. Quim. Biol., FCEyN, UBA

Un efecto in-vitro previamente descrito del virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1, HIV-1, es modificar el estado redox de la célula infectada, así como aumentar la sensibilidad de líneas celulares T frente a distintos inductores de apoptosis, como la Staurosporina (St). En este trabajo, se estudia el comportamiento in-vitro de la línea celular H9/HTLVIIIIB, de origen linfoide, persistentemente infectada con HIV-1 frente a la acción de H₂O₂ y St, que tienen distintos blancos celulares. Los niveles de apoptosis, después de un tratamiento de 24hrs con H₂O₂ 200 μ M o St 1 μ M, fueron medidos a través de una tinción simultánea con anexina-V / Ioduro de Propidio (IP) y reactivo de Hoeschst. Asimismo, se controló la viabilidad celular midiendo la funcionalidad de la succinato dehidrogenasa mitocondrial (reactivo de MTT). Los dos reactivos inductores de apoptosis fueron controlados en otras líneas celulares T no in-

fectadas. Las células persistentemente infectadas H9/HTLVIIIIB presentaron un 75% de células viables (MTT) y un aumento de apoptosis total de 18% frente al H₂O₂, con respecto al control sin tratamiento. Asimismo, en presencia de St presentaron una mínima viabilidad (entre 3-6%, por MTT) y una disminución de 10% en la apoptosis total con respecto a los controles sin tratar. Estos resultados demuestran que la línea persistentemente infectada con HIV-1 responde a ambos estímulos externos, si bien con menor sensibilidad a St que lo previamente observado en infecciones agudas in-vitro con HIV-1. Por lo tanto, la sensibilidad frente al H₂O₂ sugiere que la apoptosis puede ocurrir por vía mitocondrial, con una modificación del estado redox, o con activación de algún otro factor o enzima celular por acción de una proteína viral, tal como se ha descrito en una infección aguda para HIV-1. En contraste con ésta, cuando el blanco es el núcleo celular, las células persistentemente infectadas demuestran una resistencia a la apoptosis.

REPRODUCCIÓN 1

233. (6855) LOS MASTOCITOS REGULAN LA ANGIOGENESIS DEL CÉRVIX UTERINO DURANTE LA GESTACIÓN MODULANDO LA EXPRESIÓN DE VEGF. BOSQUIAZZO, VERÓNICA L.; RAMOS, JORGE G.; VARAYOUD, JORGELINA G.; RODRÍGUEZ, HORACIO A.; 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 gestación presenta cambios vasculares parcialmente regulados por la degranulación de mastocitos (MC). En la mayoría de los tejidos el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es el principal regulador de la angiogénesis. Nuestro objetivo fue evaluar: 1) la proliferación endotelial (como indicador de angiogénesis) y la expresión del ARNm del VEGF y 2) los niveles del ARNm del VEGF asociados a la inhibición de la degranulación de MC, en cérvix uterino de rata durante la 2da mitad de la preñez. Ratas preñadas fueron sacrificadas los días 12 (D12), D18 y D22, otro grupo de ratas recibió solución salina (controles) o un estabilizador de la degranulación de MC (cromoglicato de sodio, 87mg/kg de peso), desde D12 hasta D18 de preñez. Dos horas antes del sacrificio los animales recibieron bromodeoxyuridina (BrdU). En cortes histológicos de cérvix uterino se evaluó el índice de proliferación endotelial (IPE) por incorporación de BrdU y en homogenados de cérvix uterino se cuantificó la expresión de ARNm del VEGF por transcripción reversa seguida de PCR competitiva. El IPE y la expresión del ARNm del VEGF (attomoles/ μ g de ARN) aumentaron significativamente hacia el final de la preñez, presentando alta correlación positiva ($r = 0.87$, $p < 0.001$). En ratas preñadas de D18, cuya degranulación de MC fue inhibida por tratamiento con cromoglicato de sodio, se observó una disminución de la angiogénesis (IPE: 10.2 \pm 0.3 vs 6.8 \pm 0.7) y de la concentración del ARNm del VEGF (5.5 \pm 0.3 vs 3.6 \pm 0.3; $p < 0.05$). Estos resultados sugieren que la degranulación de MC regula la angiogénesis del cérvix uterino de la rata modulando la expresión del ARNm del VEGF.

234. (7197) MODIFICACIONES UTERINAS CAUSADAS POR LA EXPOSICIÓN POSTNATAL TEMPRANA A ESTRÓGENOS SINTÉTICOS. VARAYOUD, JORGELINA; RAMOS, J GUILLERMO ; MONJE, LUCAS; MUÑOZ DE TORO, MÓNICA; LUQUE, ENRIQUE H

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

El útero completa su desarrollo morfogenético en las primeras semanas postnatales, siendo éste un período crítico para la acción de perturbadores endócrinos que afecten la salud reproductiva. El bisfenol A (BPA) y el dietilstilbestrol (DES) son

estrógenos sintéticos a los que el hombre y los animales pueden estar expuestos. El objetivo fue investigar si la exposición postnatal a BPA o DES modifica la expresión del receptor de estrógeno alfa (REa) y de progesterona (RP) en útero. Ratas hembras (Wistar) se inyectaron sc con BPA (20 mg/kg), DES (0.2 µg/kg y 20 µg/kg) o vehículo (Control), desde el día 1 postnatal (PND1) hasta PND7. Se extrajeron los úteros en PND8 y PND21 que se incluyeron en parafina. Por inmunohistoquímica y análisis de imágenes se cuantificó el REa y de RP. En el PND8, la expresión de RP fue menor en el epitelio luminal (EL) de ratas tratadas con DES y BPA (6.19±1.32 y 10.11±2.06 versus 17.35±1.63, $p<0.05$), mientras que el estroma (S) presentó un aumento sólo con DES (4.72±0.48 versus 1.77±0.68; $p<0.05$). En el PND21 no hubo diferencias en la expresión de RP en EL y S, sin embargo, en el epitelio de las glándulas endometriales de animales tratados con xenoestrógenos los valores del RP fueron más altos (DES: 28.44±1.74; BPA: 21.33±1.76; Control: 12.13±0.98; $p<0.05$). La expresión de REa no se modificó en las hembras con BPA, mientras que el DES alteró significativamente la expresión en el EL y el S de este receptor en PND8 y 21 ($p<0.05$). Los resultados demuestran que la exposición postnatal temprana a BPA y DES afecta la expresión de RP y REa en varios compartimientos celulares uterinos. Estas modificaciones podrían modificar el sistema de señales que controlan la diferenciación y la adenogénesis del útero lo que podría alterar la eficiencia reproductiva.

235. (7327) CARACTERIZACIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS EN UN MODELO MURINO DE TUMOR DE OVARIO DE TIPO TERATOMA. GONZÁLEZ, BETINA (1); POUTANEN, MATTI (2); HUHTANIEMI, ILPO (3); CALANDRA, RICARDO (1); RULLI, SUSANA (1)

(1) *Instituto de Biología y Medicina Experimental.* (2) *Depto de Fisiología, Univ. de Turku, Finlandia;* (3) *London Imperial Colledge, Londres, UK*

La angiogénesis es un proceso fundamental en el crecimiento y desarrollo de tumores, así como en el desarrollo embrionario normal, y es regulado en respuesta a la demanda de sustratos y a diferentes factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. Entre ellas, se ha propuesto a la gonadotropina coriónica humana (hCG) como posible factor regulador de la angiogénesis. Previamente hemos demostrado (SAIC, 2003) que la expresión elevada de hCG en ratones transgénicos desarrolla tumores de ovario de tipo teratoma. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la expresión de factores angiogénicos en dichos tumores. La hCG circulante se encuentra significativamente aumentada en los ratones transgénicos (hCG+: 10350±2076 UI/L), mientras que en los controles (wt) no fue detectable. Se determinaron los pesos de ovarios wt y hCG+ a las 4 (wt: 1.9±0.1; hCG+: 6.3±0.4, $p<0.05$), 6 (wt: 3.2±0.1; hCG+: 17.7±1.1, $p<0.05$) y 8 (wt: 4.8±0.3; hCG+: 137±34.8, $p<0.05$) semanas de edad. A las 6 semanas se demostró la presencia de células gigantes de trofoblastos en el ovario hCG+, mientras que a partir de las 8 semanas se identificó una masa tumoral compuesta de diversos tejidos derivados del endodermo, mesodermo y ectodermo. Se analizó por RT-PCR, la expresión génica de los distintos factores angiogénicos: VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), VEGF-B, VEGF-D y PIGF (factor de crecimiento placentario). VEGF presentó dos variantes de transcritos mayoritarias, correspondientes a isoformas de 164 y 120 aminoácidos. La expresión relativa de las dos variantes de VEGF y PIGF aumentaron significativamente en los tumores ováricos ($p<0.05$), mientras que VEGF-B y VEGF-D no mostraron cambios apreciables. Estos resultados sugieren que la expresión crónica de hCG estaría involucrada en promover la angiogénesis necesaria para nutrir y mantener el rápido crecimiento de los teratomas, posiblemente a través de la expresión de sus principales factores angiogénicos PIGF y VEGF.

236. (7525) EFECTO DEL DI-2-(ETILHEXIL) FTALATO (DEHP) SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ZO-1, OCLUDINA Y CX-43, PRESENTES EN LAS UNIONES

INTERCELULARES DEL TÚBULO SEMINÍFERO DE RATAS PREPÚBERES. SOBARZO, CRISTIAN (1,2); LUSTIG, LIVIA (1); DENDUCHIS, BERTA (1)

(1)*Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina UBA, Buenos Aires .* (2)*Fac.Cs. UCT , Temuco-Chile*

Las interacciones entre las células de Sertoli y entre estas y las células germinales, son esenciales para la estructura normal del epitelio germinal. El DEHP es un compuesto químico ambiental con toxicidad específica para las células de Sertoli. El objetivo de este trabajo fue estudiar las variaciones en la expresión de las proteínas zonula occludens (ZO-1) y ocludina, asociadas a uniones estrechas y conexina 43 (Cx-43) a uniones nexo, en el testículo de ratas prepúberes tratadas con DEHP. Se intoxicaron vía «gavage», ratas Sprague Dawley de 27 días de edad con 2 g de DEHP/kg de peso corporal, durante 2 días consecutivos (T), utilizándose como controles (C) ratas a las que se les administró aceite usado como vehículo. Las ratas fueron sacrificadas 24 horas después del tratamiento. Por inmunofluorescencia (IF), se localizó la proteína ZO-1 principalmente en el compartimiento (CT) basal de los túbulos seminíferos (TS) en los animales C y T. El patrón de IF en las ratas C fue lineal y continuo, siendo la IF discontinua en los animales T. Una localización distinta de la proteína Cx-43 se observó entre ratas C y T. En las primeras se detectó una IF intensa y continua en la zona basal de los TS y discontinua en el CT ad-luminal, mientras que en las ratas T la IF sólo se observó en el CT basal. Por «Western blot» (WB), se detectó una banda de 43 kDa (Cx-43) y de 65 kDa (occludina), en las ratas C y T, observándose una disminución de la expresión de ambas proteínas, de aproximadamente 50 y 70% respectivamente, en los animales T con respecto de los C. La pérdida de expresión de Cx-43 en el compartimiento basal y la alteración del patrón de IF de Cx-43 y ZO-1, así como la disminución en la expresión de Cx-43 y ocludina, observadas por WB en las ratas tratadas sugieren que el DEHP ejerce su efecto tóxico, actuando sobre las uniones intercelulares, desorganizando la arquitectura del epitelio germinal.

237. (7533) CAMBIOS EN LA PRODUCCIÓN DE PROTAGLANDINAS (PGS) Y ÓXIDO NÍTRICO (NO) UTERINO DURANTE LA GESTACIÓN TEMPRANA LUEGO DEL CONSUMO PERICONCEPCIONAL DE ALCOHOL, EN EL RATÓN. CLADOUCHOS, M. LAURA (1); FALETTI, ALICIA (2); PAZ, DANTE (1); CEBRAL, ELISA (1,2)

Laboratorio de Biología del Desarrollo-IFIBYNE (1). CEFYBO (2). CONICET

El consumo crónico de alcohol durante la preñez prolonga la gestación mientras que el agudo induce parto prematuro. Poco se conocen los mecanismos de acción del alcohol sobre el útero preñado. Se estudió si el consumo periconcepcional de alcohol altera los niveles de PGs y NO uterinos y la progesterona sérica (P4) en las fases de pre y postimplantación e induce daño histológico en los sitios de implantación. Ratones hembras adultas se intoxicaron con 10% etanol en el agua de bebida 17 días antes de la preñez y durante la gestación hasta el día 4 y 10 (HT), con sus controles correspondientes (HC). Se extrajeron útero (día 4), miometrio y decidua (día 10) para determinar la producción de PGE y PGF2-alfa y la P4 sérica mediante RIA y los niveles de nitratos/nitritos (Ns) por la reacción de Griess. Los sitios de implantación de HC y HT fueron procesados histológicamente para evaluar la integridad tisular de la decidua. Al día 4, la producción de PGE y PGF2 no se alteró, el nivel de Ns resultó mayor en las HT respecto de las HC ($p<0.05$). Al día 10, aumentaron la PGF2 miometrial y decidua ($p<0.01$ y $p<0.05$) y la producción de Ns en ambos tejidos respecto de las HC ($p<0.05$). Los niveles de P4 no se modificaron en ningún período. En los sitios de las HT hubo diferente grado de decidualización y de diferenciación de las células estromales. Los efectos del consumo perigestacional de alcohol serían el aumento de estrés oxidativo por elevados niveles de NO, desde la fase de preimplantación, lo que desencadena-

rían alteraciones histológicas de la decidua del sitio de implantación al día 10. Además, el incremento de PGF2 produciría desregulación del mantenimiento de la quiescencia uterina desde la mitad de la gestación. Estos cambios tempranos podrían comprometer la actividad uterina durante la preñez, el flujo sanguíneo feto-placentario y el parto a término.

238. (7651) MODULACIÓN DE LAS FOSFOLIPASAS A2 CITOSÓLICA Y SECRETORIA EN ÚTERO DE RATA DURANTE LA PREÑEZ. FARINA, MARIANA; BILLI, SILVIA; GUADAGNOLI, TAMARA; RIBEIRO, MARÍA LAURA; FRANCHI, ANA MARÍA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO-CONICET)

Las prostaglandinas (PGs) juegan un rol primordial en numerosos procesos reproductivos. La liberación del ácido araquidónico (AA) de los glicerofosfolípidos de la membrana, vía la acción de fosfolipasas (PL), es el primer paso en la biosíntesis de PGs. Aunque varias PL catalizan este paso las más importantes en tejidos reproductivos son la PLA[2] citosólica (cPLA[2]) y las isoformas II y V de la secretoria (sPLA[2]), que hidrolizan la unión éster de la posición sn-2 de los fosfolípidos de membranas, con la subsecuente liberación del AA. Objetivo: Estudiar la presencia y modulación de las cPLA[2] y sPLA[2] en útero de rata durante la preñez. Métodos: En fragmentos uterinos provenientes de animales en diferentes días de preñez se determinó la actividad por ELISA, los niveles de RNAm por RT-PCR y los niveles proteicos por Western Blot de cPLA[2] y sPLA[2]. Resultados: Los niveles de actividad de sPLA[2] fueron bajos durante la preñez temprana (día 5: 7.8 ± 1.6 nmol/min/ml) y media (día 13: 6.7 ± 0.4); comparados con los úteros de ratas no preñadas (14.5 ± 1.2), y aumentaron al final de la preñez (día 21: 13.3 ± 0.9), en concordancia con el incremento de PGs que ocurre previo al parto. Los niveles del RNAm de la sPLA[2] tipo II mostraron un incremento al final de la preñez (2.3 ± 1.8 sPLA[2] II referido al RNAm de actina); mientras que se observó un aumento en el RNAm de la sPLA[2] tipo V en úteros de ratas no preñadas. La actividad de la cPLA[2] fue baja en tejido de ratas no preñadas, así como también en preñez temprana; mientras que aumentó durante la preñez media (día 13: 8.7 ± 0.3 nmol/min/ml) y en los días previos al parto (día 21: 11.01 ± 0.3). Los niveles proteicos mostraron un incremento hacia el final de la gestación. El útero de rata expresa la cPLA[2] y las isoformas II y V de la sPLA[2] y sus niveles de actividad, proteína y RNAm se encuentran modulados durante la gestación, sugiriendo que participan en el control de la síntesis de PGs durante la preñez y el parto.

239. (7742) SISTEMA ENDOCANABINOIDES-RECEPTORES DE CANABINOIDES DURANTE LA PREÑEZ EN EL RATÓN. CELLA, MAXIMILIANO; BILLI, SILVIA; FRANCHI, ANA M

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)

Los endocannabinoides son una nueva familia de mediadores lipídicos aislados en cerebro y otros tejidos periféricos, con las propiedades psicotrópicas, tranquilizantes y analgésicas de los cannabinoides. Los cannabinoides, en particular el delta 9-tetrahidrocannabinol, tienen efectos adversos en las funciones reproductivas y el aumento de la concentración de anandamida (AEA), principal endocanabinoide, se ha relacionado con abortos durante la preñez temprana. La anandamida es el ligando endógeno de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el sistema endocannabinoides-receptores de endocannabinoides durante la preñez en ratón. La síntesis de anandamida se evaluó por la conversión de ácido araquidónico marcado en anandamida y su posterior separación por cromatografía en placa delgada. La expresión de los receptores CB1 y CB2 se estudió por la técnica de Western blot. El útero de ratonas no preñadas, así como el proveniente de animales preñados en días 5,8,11,13,15,18,19 sintetiza anandamida. La producción de este endocanabinoide fue mayor

en úteros de animales no preñados (3.2 ± 0.3 nmol AEA/mg tej. x h) que los de animales gestantes (día 5: 0.5 ± 0.1 , $p < 0.001$). La síntesis de anandamida es menor en la primera parte de la preñez, es máxima en la preñez media (día 13: 2.2 ± 0.5) y disminuye antes del parto (día 18: 1 ± 0.2). Se encontró que ambos receptores para cannabinoides están presentes en el útero de ratón preñado. La expresión del receptor CB1 es baja durante la implantación (día 5: 1477 pixeles), siendo significativamente mayor durante el resto de la preñez (día 8: 3632 pixeles) y disminuyendo antes del parto (día 18: 2056). Por otro lado la expresión del receptor CB2 es mínima en el día 5 (842) y máxima en el día 8 (3604). Los resultados muestran que tanto la síntesis de anandamida como la expresión de sus receptores está modulada durante la preñez y que sus niveles son mínimos durante la implantación, período en el cual altos niveles del endocanabinoide inhiben la receptividad uterina.

240. (7789) REGULACIÓN DEL SISTEMA ANANDAMIDA (AEA)/RECEPTORES DE ENDOCANABINOIDES (CB1/CB2) DURANTE EL CICLO ESTRAL EN LA RATA. RIBEIRO, MARÍA LAURA; BILLI, SILVIA; VERCELLI, CLAUDIA; FARINA, MARIANA; FRANCHI, ANA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO, CONICET)

En las mujeres el aborto espontáneo durante las primeras etapas de la gestación es una de las causas más frecuentes de pérdida del embarazo. La AEA sería un modulador de los procesos que ocurren durante la preñez temprana ya que la exposición a altas concentraciones de AEA es tóxica para el desarrollo embrionario y la implantación. Se ha informado que la AEA interacciona con dos tipos de receptores: CB1 y CB2. El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad de la AEA sintasa (conversión de [14C]-ácido araquidónico y etanolamina en [14C]-AEA) y la expresión de CB1 y CB2 (western blot) durante el ciclo estral en el útero y en el oviducto. En el caso del útero, el estudio de la regulación de la síntesis de AEA y la expresión de sus receptores no se ha realizado en profundidad y es la primera vez que se describe en el oviducto. Hembras Wistar se sacrificaron en distintos días del ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro). Tanto en útero como en oviducto se detectó actividad de AEA sintasa en los cuatro estadios del ciclo estral. En el útero la síntesis de AEA fue máxima durante el estro (1.40 ± 0.13 nmoles AEA/mg prot/1h, $p < 0.01$), mientras que en el oviducto la máxima actividad de AEA sintasa se registró tanto en proestro (10.80 ± 0.30 , $p < 0.001$) como en estro ($10.40 \pm 0.20/1h$, $p < 0.001$). La expresión de CB1 y CB2 se detectó en útero y oviducto en todos los estadios analizados. En el útero, CB1 se mantuvo constante mientras que CB2 disminuyó en el estro ($p < 0.05$). En el oviducto en proestro la expresión de CB1 fue máxima ($p < 0.05$) mientras que la de CB2 fue mínima ($p < 0.01$). Estos resultados indican que la actividad de AEA sintasa y la expresión de CB1 y CB2 se encuentran presentes tanto en el útero como en el oviducto de rata y están reguladas durante el ciclo estral, sugiriendo que el estradiol y la progesterona podrían regular este sistema en los eventos que ocurren durante la preñez temprana.

241. (7793) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN UTERINA DEL RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (R-EGF) Y DE LA CONCENTRACIÓN AMNIÓTICA DE EGF DURANTE LA PREÑEZ. VERCELLI, CLAUDIA; BILLI, SILVIA; FARINA, MARIANA; MEISS, ROBERTO (1); VILLALÓN, MANUEL (2); FRANCHI, ANA; RIBEIRO, MARÍA LAURA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO, CONICET). (1) Academia Nacional de Medicina (2) Fac. Biología, Pontificia Universidad Católica de Chile

Hemos observado que la administración intra-uterina de 500 ng de EGF en el día 21 de preñez retrasa 18 ± 0.6 horas el inicio

del parto por un mecanismo que prolonga la vida de los cuerpos lúteos manteniendo la secreción de progesterona y su efecto relajante sobre la contractilidad uterina. Además hemos detectado expresión del R-EGF y su forma activa fosforilada (pR-EGF) en membranas fetales y placenta de rata a lo largo de la preñez. Con el objetivo de analizar el efecto del EGF endógeno en el parto, se estudió durante la preñez: 1) la expresión uterina (Western Blot) de R-EGF y pR-EGF y su regulación por estradiol (E) y progesterona (P); 2) la concentración de EGF en líquido amniótico (LA) por RIA. Hembras Wistar se sacrificaron en los días 5, 13 y 18 a 22 de preñez. Por otro lado, hembras ovariectomizadas (ovx) recibieron E (4 ug/kg), P (4 mg/kg) o E+P y se sacrificaron 18 horas después. El útero presentó bandas de 170 y 150 KDa para el R-EGF. La isoforma de 170 KDa aumentó al inicio (días 5 y 13) y al final (día 22) de la gestación ($p < 0.01$), mientras que la de 150 KDa se mantuvo constante aumentando en el día 22 ($p < 0.001$). La expresión del pR-EGF coincidió con lo observado para la banda de 170 KDa. El tratamiento con E, P o E+P aumentó la expresión de ambas formas del R-EGF sin mostrar diferencias entre los tratamientos ($p < 0.01$ vs ovx). El E aumentó más que la P la expresión del pR-EGF ($p < 0.001$; $p < 0.01$ vs ovx). La co-administración de E+P anuló el aumento observado con E sólo. La concentración de EGF en el LA fue máxima en el día 21 (557 ± 20 pg/ml, $p < 0.001$), disminuyendo doce horas después (190 ± 19 pg/ml). Estos resultados indican que el R-EGF se encuentra presente en el útero de rata durante la gestación y que el mismo está activado. Tanto la expresión del R-EGF como su forma activa y la concentración de EGF en LA están reguladas durante la preñez y por hormonas sexuales.

242. (7912) MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ARIL HIDROCARBUROS (AHR) POR SEÑALES MITOGÉNICAS Y POR EL AGONISTA β -NAFTOFLAVONA (β -NF) EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA (GC) DE RATA. BUSSMANN, URSULA; BUSSMANN, LEONARDO; BARAÑO, LINO

Instituto de Biología y Medicina Experimental CONICET. Departamento Química Biológica, FCEyN, UBA

El AhR al ser activado por un agonista actúa como factor de transcripción de varios genes, como las hidroxilasas CYP1A1 y CYP1B1. Su delección genera infertilidad, pero paradójicamente algunos ligandos producen alteraciones reproductivas. Además, aún no se ha identificado su ligando endógeno. Hallamos que β -NF posee un efecto comitogénico con estradiol (E2) en presencia de FSH en cultivos de GC, mediado por el receptor de estrógenos y por el AhR. Como el efecto clásico del AhR es antiestrogénico, los objetivos de este trabajo fueron determinar si β -NF es agonista en este sistema y evaluar a su vez la modulación de la expresión del AhR por este ligando y las hormonas. Para esto, se cuantificó los niveles de mRNA para CYP1A1 y CYP1B1 en cultivos de GC tratados con β -NF (10 μ M) en presencia de FSH (2 ng/ml) por medio de RT-PCR semicuantitativa y se observó además la localización celular del receptor por IF luego de tratar con los estímulos. El efecto de FSH, E2 (100 ng/ml) y β -NF sobre la expresión del AhR fue evaluado por Western Blot o IF. β -NF indujo la expresión del mRNA de CYP1A1: 0.86 ± 0.08 vs. 0.55 ± 0.03 del control tratado sólo con FSH ($p < 0.05$). El antagonista del AhR α -NF (1 μ M) revirtió este efecto: 0.68 ± 0.05 ($p < 0.05$). A su vez, β -NF aumentó los niveles de mRNA para CYP1B1: 1.06 ± 0.04 vs. 0.87 ± 0.03 del control ($p < 0.05$). β -NF en presencia de FSH y E2 produjo un aumento en la localización nuclear del AhR. FSH disminuyó los niveles de proteína AhR, inhibiéndose más su expresión al tratar con FSH y E2. β -NF, en presencia de FSH o con FSH y E2, disminuyó aún más la expresión del receptor. Los altos niveles constitutivos de mRNA para CYP1B1 y la localización nuclear del AhR aún en ausencia de ligando exógeno dan evidencias de la presencia de un ligando endógeno para este receptor en GC. Estos resultados indican que β -NF es agonista del AhR en GC de rata y que la expresión del receptor es inhibida por señales mitogénicas y por el propio agonista.

243. (7994) INMUNOLocalIZACIÓN DE CADERINA N EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS Y EVALUACIÓN DE SU PARTICIPACIÓN EN EL PROCESO DE FECUNDACIÓN. MARÍN-BRIGGILER, CLARA; LENTZ, EZEQUIEL; VEIGA, FLORENCIA; GONZALEZ-ECHEVERRÍA, FERNANDA; VAZQUEZ-LEVIN, MÓNICA

IBYME, CONICET-UBA. Fertilab

Las caderinas son glicoproteínas de membrana que intervienen en la adhesión celular. Evidencias preliminares sugieren la presencia de caderina N (cad-N) en la superficie de espermatozoides (Rufas et al, 2000) y la existencia de transcritos espermáticos (Goodwin et al, 2000). El objetivo del trabajo fue determinar la presencia y localización de cad-N en espermatozoides humanos y evaluar su participación en el proceso de fecundación. En los estudios se utilizó un anticuerpo policlonal anti cad-N (Santa Cruz Biotech.). En ensayos de «Western immunoblotting» de proteínas espermáticas se detectó una forma mayoritaria de 113 KDa, resistente al tratamiento de los espermatozoides con un buffer con NaCl 1 M. Esta forma también fue detectada en extractos proteicos de testículo y en plasma seminal. Cad-N fue inmunolocalizada predominantemente en el segmento ecuatorial y en la región acrosomal de espermatozoides del eyaculado ($62 \pm 7\%$, media \pm EEM; $17 \pm 10\%$) y capacitados por 18 h ($51 \pm 8\%$; $30 \pm 8\%$) ($n=5$). En espermatozoides reaccionados, cad-N fue detectada principalmente en el segmento ecuatorial ($84 \pm 2\%$ de las células) ($n=3$). Todos los espermatozoides mostraron tinción específica para cad-N en el flagelo. La preincubación de los espermatozoides con anti cad-N (100 μ g/ml) no afectó su unión a la zona pellucida (ZP) homóloga (anti cad-N = 29 ± 11 vs Control = 33 ± 12 espermatozoides unidos/hemizona) ($n=6$). Contrastando, estudios preliminares revelaron que la preincubación de ovocitos de hamster sin ZP con anti cad-N (20 μ g/ml) condujo a una disminución en el % de ovocitos penetrados por los espermatozoides humanos (anti cad-N = 40% vs Control = 100%) ($n=2$). Los estudios describen la presencia y localización de cad-N en espermatozoides humanos del eyaculado, capacitados y reaccionados, y sugieren su participación en la adhesión/fusión del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito.

BIOLOGÍA CELULAR 1

244. (7076) LA MOLÉCULA RECOMBINANTE SCFV-5.01, REACTIVA CON LA TETRASPANINA CD63, SE INTERNALIZA Y ALCANZA LOS COMPARTIMENTOS MIIC EN CÉLULAS DENDRÍTICAS INMADURAS HUMANAS. MANTEGAZZA, ADRIANA; COLOMBO, MARINA; GUERRI, LUCÍA; BARRIO, MARCELA; MOUTEL, SANDRINE; TEILLAUD, JEAN-LUC; MORDOH, JOSÉ

Fundación Instituto Leloir. INSERM, Unité 255, Centre de Recherches Biomédicales des Cordeliers, París, Francia

Las Tetraspaninas constituyen una superfamilia de proteínas de membrana, ampliamente distribuidas, involucradas en la activación, adhesión, migración y transducción de señales celulares. CD63 se expresa en la superficie y en endosomas y lisosomas de células de melanoma, macrófagos y células dendríticas (CD), entre otros tipos celulares. Anteriormente, presentamos evidencias a favor del posible rol de CD63 en la presentación antigénica: El anticuerpo monoclonal (AMC) FC-5.01, desarrollado en nuestro laboratorio, forma un complejo de superficie con CD63, es internalizado y alcanza los compartimentos ricos en moléculas MHC de clase II (MIICs), involucrados en la presentación antigénica. Debido a su menor inmunogenicidad y gran versatilidad para la construcción de moléculas quiméricas, decidimos construir una molécula recombinante (scFv) a partir del clonaje de las porciones variables de la cadena pesada y liviana del AMC FC-5.01. El scFv-5.01 fue expresado en bacterias y purificado a partir de la fracción periplásmica mediante

cromatografía de afinidad por metales, obteniéndose un rendimiento de 130 ug scFv/l de cultivo. La reactividad de la molécula se evaluó mediante Western blot sobre extractos de CD y plaquetas e inmunofluorescencia sobre CD y células de melanoma. Por medio de citometría de flujo, se detectó una reactividad del 60% con células de melanoma, con una intensidad media de fluorescencia de 37. Mediante microscopía confocal observamos que scFv-5.01 se internaliza en CD inmaduras humanas y colocaliza con moléculas MHC de clase II. La molécula recombinante scFv retiene la especificidad para el antígeno CD63 del anticuerpo parental. Dicha molécula es capaz de internalizarse en CD inmaduras humanas, alcanzando los compartimentos MHCs, donde tiene lugar el procesamiento y cargado de los péptidos a ser presentados por las CD en el contexto del MHC de clase II.

245. (7271) LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE C/EBP β SE INHIBE POR SUMOILIZACIÓN. PIWIEN PILIPUK, GRACIELA (1, 2); MAZURKIEWICZ-MUÑOZ, ANNA (2); IÑIGUEZ-LLUHÍ, JORGE (2); SCHWARTZ, JESSICA (2)

Fundación Instituto Leloir, CONICET, Buenos Aires, Argentina Dept. of Physiology, The University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan, USA

Los cambios dinámicos en la expresión de genes dependen de la integración de señales positivas y negativas que regulan la actividad de factores de transcripción a través de modificaciones post-traduccionales. Por ej., la fosforilación de C/EBP β mediada por hormona de crecimiento (GH) activa su capacidad transcripcional. Otro posible mecanismo es la incorporación de un resto SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) a lisinas presentes en la secuencia consenso zKxE. C/EBP β , un factor que hemos demostrado participa en la regulación del protooncogen c-fos, posee dicha secuencia en la Lys133. Por ello, investigamos si C/EBP β puede ser sumoilizado y su consecuencia funcional. Para evaluar si la Lys133 es un sitio aceptor de SUMO se la mutó a Ala (C/EBP β K133A). His-C/EBP β o His-C/EBP β K133A fue co-expresado con HA-SUMO-1, HA-SUMO-2 ó HA-SUMO-3, y purificado en columnas de Ni-agarosa. Por Western blot se evidenció que todas las formas de SUMO modifican a C/EBP β nativo, pero no a C/EBP β K133A. Ambos C/EBP β traducidos in vitro interactúan con la enzima sumoilizante Ubc9, pero sólo C/EBP β nativo fue sumoilizado, reforzando la idea que la Lys133 es el sitio aceptor de SUMO. Se sabe que la sumoilización disminuye la actividad de factores de transcripción. Consistente con ello, C/EBP β K133A fue más activo que C/EBP β nativo con genes de reporte que poseen múltiples sitios C/EBP, así como también con un gen de reporte dirigido por el promotor de c-fos. En presencia de C/EBP β K133A, la actividad de c-fos fue equivalente a la respuesta estimuladora de GH. Estos resultados demuestran que C/EBP β se sumoaliza en la Lys133 y sugieren que estímulos tales como GH podrían regular a C/EBP β por balance entre su estado de fosforilación (señal positiva) y de sumoilización (señal negativa).

246. (7536) IMPORTANCIA DEL RECEPTOR GB3 EN LA ACCIÓN DE STX2 SOBRE EL EPITELIO INTESTINAL. NÚÑEZ, PABLO (1); PISTONE CREYDT, VIRGINIA (1); BIBINI, MARIEL (2); ZOTTA, ELSA (1); IBARRA, CRISTINA (1)

(1)Laboratorio de Fisiopatogenia, Dpto. de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA. (2)Centro Nacional de Referencia para SIDA, Fac. de Medicina, UBA

E. coli enterohemorrágica (EHEC) productora de toxina Shiga (Stx) causa una variedad de síntomas clínicos caracterizada por diarrea acuosa, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). En Argentina, el SUH es la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños menores de 5 años y se produce por la acción de Stx en la nefrona renal luego de trasladar la barrera intestinal y alcanzar la circulación sistémica. El objetivo de nuestro trabajo es dilucidar los mecanismos por los cuales Stx2 atraviesa el epitelio intestinal. En este estudio se caracterizaron los efectos de Stx2 y de la subunidad B de Stx2

(Stx2B) en las líneas celulares Caco-2 (Gb3+) y T84 (Gb3-) aceptadas como modelos de intestino humano. Las células se cultivaron hasta confluencia y luego se incubaron en arresto de crecimiento durante 1, 6, 18 y 24hs con distintas concentraciones de Stx2 o de Stx2B. La viabilidad celular se cuantificó mediante la incorporación de rojo neutro y la apoptosis celular por fragmentación de ADN y citometría de flujo. Los resultados demostraron que Stx2 disminuyó la viabilidad celular de Caco-2 de manera dosis y tiempo dependiente, siendo significativa a concentraciones de 10 pg/ml a 1h de incubación y de 0.1 pg/ml a tiempos mayores ($p < 0.05$). Así mismo la toxina estimuló la apoptosis celular. En T84, Stx2 disminuyó significativamente la viabilidad celular a partir de 18hs de incubación pero a concentraciones 10(7) veces mayores que en Caco-2 ($p < 0.001$). No se observó estimulación de apoptosis con concentraciones de hasta 1µg/ml. En ambas líneas celulares, 100ng/ml de Stx2B no produjo cambios significativos. Estos resultados demuestran que los mecanismos de acción de Stx2, pero no de Stx2B, sobre el epitelio intestinal pueden ser dependientes e independientes del receptor Gb3 y que los efectos citotóxicos que resultan son más eficaces cuando el receptor esta presente.

247. (7631) INTERACCION DE COACTIVADORES DE LA FLIA P160 CON EL FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS (AIF) Y HSP90. COLO, GEORGINA P; ECHEVERRIA, PABLO C; RUBIO, MA FERNANDA; NOJEK, IGNACIO M; ALVARADO, CECILIA V; NAHMOD, VICTOR E; COSTAS, MONICA A

Instituto De Investigaciones Medicas A. Lanari

Los coactivadores se encuentran sobreexpresados en ciertos tumores, y podrían estar contribuyendo al desarrollo tumoral a través de la disminución de la sensibilidad a apoptosis. Hemos demostrado previamente que la molécula RAC3 es un coactivador del factor de transcripción anti-apoptótico NF- κ B, y que su sobreexpresión disminuye la sensibilidad a apoptosis en células HEK 293 estimuladas con peróxido de hidrogeno, no solo aumentando la expresión de genes blanco de NF- κ B, sino también disminuyendo translocación de AIF al núcleo. Ha sido demostrada la interacción específica de AIF con hsp70, antagonizando el efecto pro-apoptótico. Por otra parte se observó la interacción funcional de un heterocomplejo hsp90 (hsp90, hsp70, Hop, hsp40 y p23), con receptores esteroides y proteínas de señalización, donde hsp90 interacciona directamente con hsp70 en la mayoría de los casos. De acuerdo con estas evidencias, nuestra hipótesis de trabajo es que RAC3 podría estar afectando la translocación de AIF al núcleo por un mecanismo diferente y adicional al de su acción en el núcleo como coactivador. Se estudió la posible formación de complejos conteniendo a RAC3, hsp90 y AIF, por co- inmunoprecipitados, western blot e inmunofluorescencia, en células HEK 293 que sobreexpresan RAC3 y en fibroblastos humanos, en condiciones basales y estimuladas con peróxido de hidrógeno. Se observó la formación de complejos conteniendo RAC3, AIF y hsp90. La sobreexpresión de RAC3 podría estar protegiendo de la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno en distintas líneas celulares, no solo aumentando la actividad anti-apoptótica de NF- κ B, sino antagonizando el efecto pro-apoptótico de AIF, vía la interacción física con esta molécula y hsp90, muy probablemente regulando su translocación al núcleo.

248. (7745) TIF2 REGULA LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE NF- κ B A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN CON QUINASAS DE LAS FAMILIAS MEK Y ERK. NOJEK, IGNACIO; WERBAJH, SANTIAGO; COLÓ, GEORGINA; RUBIO, MARÍA FERNANDA; COSTAS, MÓNICA A

Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Lanari-UBA. Instituto de Investigaciones Bioquímicas Dr. Leloir

Está demostrado que p38 MAPK y las quinasas activadas por mitógenos ERK son requeridas para la actividad transcripcional de NF- κ B en respuesta a TNF, aunque no se conoce el modo

por el cual estas quinasas regulan la actividad de NF- κ B. Por otro lado, demostramos previamente que la sobreexpresión de coactivadores de receptores nucleares aumenta la actividad NF- κ B en forma dosis dependiente, y la presencia de diversas quinasas en complejo coactivador/NF- κ B, siendo el coactivador TIF2 sustrato de la kinasa p38. Con el objeto de estudiar el rol de estas quinasas y el coactivador TIF2 en la actividad transcripcional de NF- κ B, analizamos en células HEK 293 transfectadas transitoriamente con vector de expresión de TIF2, estimuladas o no con TNF 20 ng/ml, por medio de ensayos reporteros, traducción in vitro de proteínas, ensayos de inmunoprecipitación y Western Blots las posibles interacciones entre el coactivador y las quinasas involucradas en la activación de NF- κ B, así como los niveles de expresión de I κ B. Observamos que: 1) la actividad de p38 MAPK y ERK son requeridas para la transactivación de NF- κ B dada por TIF2 en ensayos reporteros, en presencia de inhibidores específicos de ambas vías; 2) el bloqueo de p38 inhibe la degradación de I κ B 3) TIF2 se asocia con ERK. Las diferentes vías de transducción de señales de NF- κ B regularían la activación de activadores o represores, regulando la expresión de genes blanco de este factor de transcripción. Estas observaciones resultarían relevantes para el conocimiento del control de la expresión génica en tumores que sobreexpresan coactivador.

249. (7768) CARACTERIZACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y MOLECULAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN EPITELIO INTESTINAL ASOCIADO A FOLÍCULOS LINFÓIDES (FAE). RUMBO, MARTIN; ANDERLE, PASCALE 2; SIERRA, FREDERIC 2; MICHETTI, PIERRE 3; KRAEHNBUHL, JEAN PIERRE 2

Catedra de Inmunología, UNLP, ISREC 2 Institute Suisse de Recherche Experimentale sur Cancer, Lausanne Suisse. 3 CHUV, Lausanne, Suisse.

En el tracto gastrointestinal, el tejido linfóide organizado está asociado a un epitelio especializado (FAE), adaptado al muestreo antigénico del contenido intestinal. El FAE se caracteriza por la presencia de células M, y enterocitos de baja expresión de funciones digestivas y expresión selectiva de la quimocina CCL20. El direccionamiento de antígenos hacia el FAE aumenta la respuesta inmune de mucosas, lo que se puede explotar para el mejoramiento de sistemas de vacunación. El objetivo de este trabajo fue estudiar la biología y buscar nuevos marcadores moleculares del FAE. Mediante hibridación in situ y empleo de agonistas en modelos in vitro e in vivo se identificó la señalización a través del receptor de linfotóxina beta (LT β R) como disparador de la expresión de CCL20 en epitelio intestinal, siendo este un mecanismo responsable de su expresión selectiva en el FAE. A fin de identificar otras moléculas específicas del FAE, se seleccionaron genes corregulados con CCL20 sobre líneas celulares derivadas de epitelio intestinal (Caco-2 y T84) estimuladas con linfotóxina beta, TNF α o flagelina. Los distintos ligandos empleados activan diversas vías de señalización intracelular en cada tipo celular, generando la expresión diferencial de distintos sets de genes que fueron identificados por hibridación en microarrays GeneChip U133A (Affymetrix). Empleando análisis de clusters se agruparon genes corregulados con CCL20 seleccionando 15 genes candidatos. La validación in vivo fue realizada por RT-PCR sobre tejido obtenido por microdissección proveniente de biopsias intestinales, midiendo la expresión relativa de los genes candidatos en las distintas regiones del epitelio. Se observó que CCL23 y TNFAIP3 poseen una expresión diferencial en el FAE. La señalización dependiente de LT β R parece tener un rol central en el control de expresión de genes en el FAE. Nuevos moléculas con expresión FAE específica han sido descriptas.

250. (7770) EXTRACTOS ACUOSOS DE LARREA DIVARICATA CAV (JARILLA): INDUCCIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y DE LA APOPTOSIS DE MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS. DAVICINO, ROBERTO (1);

CASALI, YOLANDA (2); TOSCANO, NATALIA (3); CORREA, SILVIA (3); BLAS, MICALIZZI (1)

Cátedra Inmunología UNSL. (1) Cat. Inmunología, (2) C. Cal.Med. Fac. Quím. Bioq. Farm.UNSL, (3) Inmunolog Fac. de Ciencias Químicas-UNC

«Jarilla», se destaca por su abundancia, usos populares y por sus propiedades antimicrobianas. El objetivo del trabajo fue el estudio de la actividad de extractos acuosos de jarilla sobre macrófagos peritoneales murinos. A partir del material seco proveniente de la porción aérea de jarilla se prepararon extractos al 5% (p/v): infusión (I) y decocción (D). Como fuente de macrófagos (M ϕ) se utilizaron ratones normales o tratados con proteasa-peptona (10%) o tioglicolato (3%). Para estudiar el efecto de jarilla sobre el estallido respiratorio, las células adherentes se incubaron con 1; 2; 4 y 8 mg/ml de cada extracto y fueron tratados con zimosan opsonizado y nitro azul de tetrazolium al 0,1% (NBT) durante 1,5 h. Los resultados se expresaron como nmoles de NBT reducido/10(6)cél. Para evaluar la acción de jarilla sobre la producción de NO, los M ϕ fueron estimulados con LPS (10 mg/ml) y con 0,025, 0,050, 0,1 y 0,2 mg/ml de los extractos. A las 48 h, se determinó el NO producido usando el reactivo de Griess. Se estudió además si los extractos de jarilla poseen actividad pro-apoptótica sobre los M ϕ cultivados en presencia de los extractos (1,2,4 y 8 mg/ml durante 1,5 h), empleando coloración de Giemsa (G) y Bromuro de etidio/Naranja de acridina. (BE/NA). Los extractos I y D aumentaron la reducción del NBT respecto a los controles a las concentraciones de 4 y 8 mg/ml ($p \leq 0.03$). La producción de NO se vio incrementada significativamente respecto al control a la concentración de 0,2 mg/ml ($p \leq 0.01$). En los preparados coloreados con G se observaron células en apoptosis y células necróticas. Con D se observaron el 91,40% y 3,50% de las células en apoptosis y necrosis respectivamente, iguales resultados se obtuvieron con I: 97,3% y 2,7% de apoptosis y necrosis. Estos resultados fueron confirmados con BE/NA. Los extractos de jarilla potencian la activación de los M ϕ y a dosis mayores a 0,2 mg/ml los mismos inducen la muerte celular.

251. (7885) EL TRANSPORTE RETRÓGRADO DE RECEPTORES DE ESTEROIDES REQUIERE DEL COMPLEJO HSP90-INMUNOFILINA. GALIGNIANA, MARIO D. (1); PRATT, WILLIAM B. (2)

Depto. Química Biológica, Fac. Ciencias Exactas y Nat., UBA, Bs.As. (1) Depto. Quím Biol., FCEyN, UBA (2) Univ. of Michigan Med. School, Ann Arbor, MI, USA

El receptor de glucocorticoides (GR) es citoplasmático en ausencia de hormona y existe como un heterocomplejo con hsp90, hsp70, p23 y una inmunofilina (IMM) de alto peso molecular (FKBP51, FKBP52, PP5 ó CyP-40). Siempre se ha aceptado dogmáticamente que la disociación de hsp90 es requerida para permitir la translocación nuclear de GR. Sin embargo, no hay datos experimentales que apoyen este modelo clásico, por lo que estudiamos el mecanismo molecular para el movimiento de GR. Demostramos que la proteína motora dineína coimmunoprecipita con complejos GR•hsp90•FKBP52, una asociación que es competida por el extremo N-terminal de FKBP52 sin afectar la interacción de GR•hsp90 con la IMM. Dineína también se recuperó asociada a complejos nativos de GR•hsp90•IMM. La incubación de células con esteroide a cero grado (ocurre la unión de hormona pero no la translocación nuclear del receptor) promueve el reclutamiento de FKBP52 y dineína al complejo. Por otra parte, la incubación de las células con el agente disruptor de hsp90 geldanamicina decrece la velocidad de translocación de GR en igual magnitud (un orden) que la sobreexpresión del fragmento N-terminal de FKBP52. Los tratamientos no muestran adición o potenciación de la inhibición ya que afectan a la misma maquinaria de tránsito. No obstante, a tiempos largos GR igualmente alcanza el núcleo, sugiriendo la existencia de un mecanismo de transporte independiente del complejo hsp90•IMM menos eficiente, tal que si las distancias a recorrer son más largas como en un axón, y la maquinaria de transporte es altera-

da, GR se agrega y se degrada vía proteasoma. Concluimos que el complejo hsp90•IMM no se disocia inmediatamente después de unir esteroide y es requerido para el transporte citoplasmático rápido y eficiente de GR, el que utiliza a las dineínas como moléculas motoras para el movimiento retrógrado.

BIOLOGÍA CELULAR 2

253. (6840) LA HIPOXIA PERINATAL INDUCE UNA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA SUSTANCIA NIGRA Y UNA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IGF-1, IGF-BP3 Y IGF-BP5 EN EL ESTRIADO. EZQUER, MARCELO; VALDEZ, SUSANA; SELTZER, ALICIA

Instituto DE Histología y Embriología (IHEM-CONICET) Facultad De Ciencias Médicas Uncuyo, Mendoza

Episodios ocurridos en períodos tempranos de la vida podrían predisponer a enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. En el modelo de hipoxia-isquemia perinatal por ligadura de la carótida se produce una lesión del cuerpo estriado (EST), y es conocido que la hipoxia sin isquemia es mejor tolerada por el cerebro inmaduro. En trabajos previos confirmamos que la hipoxia no afecta el número de neuronas TH positivas de la Substantia Nigra (SN) pero si esta se aplica previamente a una lesión de tipo excitotóxica, hay una disminución de neuronas dopaminérgicas. El objetivo de este trabajo fue identificar factores involucrados en el preconditionamiento hipóxico. Métodos: ratas de 7 días de edad fueron hipoxiadas (O₂ 6.5%, 50 min) y se estudió por RT-PCR la expresión de factores de crecimiento y la familia de las Nos en EST y SN a distintos tiempos post lesión. También evaluamos por western blot la inmunoreactividad para iNos y GFAP como indicadores de activación de procesos inflamatorios. Resultados: El EST presentó una disminución significativa de la expresión de IGF-1 (p<0.05); IGF-BP3 (p<0.05) e IGF-BP5 (p<0.05) respecto del control, 24h después de la hipoxia. En la SN encontramos un aumento significativo de la expresión de eNos (p<0.05) 5h post hipoxia; nNos e iNos (p<0.05) 48h después de la hipoxia. Este cambio se vio acompañado por un aumento de la inmunoreactividad de iNos (p<0.05) y de GFAP (p<0.005) 48h post hipoxia en la SN; esto último confirmado por inmunohistoquímica. Un episodio temprano de hipoxia desencadena una respuesta inflamatoria en la SN y un freno en la expresión de factores de crecimiento en el EST. Este trabajo aporta nueva evidencia sobre la vulnerabilidad y respuesta diferencial de distintos grupos neuronales a las lesiones excitotóxicas.

254. (6848) EFECTO DE LA INTOXICACIÓN CON DOSIS NO CARCINOGENICA DE CADMIO EN EL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS EN PRÓSTATA DE RATA. ALVAREZ, SILVINA; GOMEZ, NIDIA; SCARDAPANE, LUIS (1); FORNES, MIGUEL (2); GIMENEZ, SOFIA

Bioquímica Molecular -(1) Histología Y Embriología - UNSL - San Luis- (2) IHEM-UNCUYO - Mendoza

El Cadmio es un contaminante ambiental. Estudios previos demostraron importantes alteraciones a nivel del epitelio prostático como disminución en su altura e invaginaciones. El objetivo fue determinar el efecto de la intoxicación crónica con Cd sobre el metabolismo lipídico en próstatas de ratas. Ratas macho Wistar fueron separadas en dos grupos: Control (Co) y Cadmio (Cd). El grupo Cd recibió 15 ppm de Cd en el agua de bebida, las Co recibieron agua potable. Se extrajeron y separaron los lípidos por cromatografía en capa fina (TLC). Se determinó el contenido de fosfolípidos (FL) y colesterol (CT) totales, y fracciones de colesterol libre (CL), esterificado (CE) y triglicéridos (TG). Se determinó la actividad de las enzimas: ácido graso sintetasa (FAS), Isocitrato deshidrogenasa (IDH), málico deshidrogenasa (MDH) y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH). El RNA total se obtuvo por el método de Trizol. Un microgramo de RNA se transcribió a cDNA y se am-

plificaron por PCR los siguientes genes: ácido graso sintetasa (FAS), Diacilglicerol acil transferasa I (DGAT I) y Lipoprotein Lipasa (LPL). β actina se utilizó como control interno. Se hizo microscopía óptica y electrónica. Se observó una disminución en el contenido de TG (Co: Cd: 148 \pm 13,62; Cd: 53,57 \pm 1.89 mg/mg protein, p<0.01). pero el resto de las fracciones no mostró diferencias significativas. Con respecto a las actividades enzimáticas, FAS no mostró diferencias (Co: 0,071 \pm 0,021; Cd: 0,067 \pm 0,018 μ mol NADPH/min/mg prot.), al igual que IDH (Co: 47,6 \pm 5; Cd: 62,8 \pm 9 mmol NADPH/min/mg prot) y MDH (Co: 17,9 \pm 5, Cd: 16,3 \pm 4,4 mmol NADPH/min/mg prot) mientras que G6PDH mostró una disminución (Co: 116,4 \pm 1,3; Cd: 73,6 \pm 10,41mmol NADPH/min/mg prot; p<0,01). La expresión de FAS y LPL no mostraron diferencias mientras que DGAT I disminuyó. Se concluye que el Cd está alterando el metabolismo lipídico a nivel de la síntesis de los triglicéridos, lo que se ve reflejado en la ultraestructura del epitelio prostático.

255. (7249) DIFERENCIAS EN LA CAPTACIÓN HIPOTALÁMICA DE NORADRENALINA EN LAS DISTINTAS ETAPAS DE SOBRECARGA DE FRUCTOSA EN LA RATA. MAYER, MARCOS; RODRÍGUEZ FERMEPIÑ, MARTÍN; PEREDO, HORACIO; FERNÁNDEZ, BELISARIO; PUYÓ, ANA

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y CONICET.

El modelo de hipertensión arterial (HTA) por sobrecarga de fructosa (F) en la rata, asimilable al síndrome X humano, presenta alteraciones metabólicas (hiperglucemia, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina) y hemodinámicas (HTA moderada), esta última relacionada con una hiperactivación del sistema nervioso simpático. Nuestro objetivo fue analizar el papel de la neurotransmisión simpática hipotalámica en la etiopatogenia de la HTA por F. Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho alimentadas con dieta standard y solución de F (10% P/V) para beber durante 4 semanas (grupo agudo=FA) y 22 semanas (grupo crónico=FC). Los controles agudo (CA) y crónico (CC) recibieron igual dieta y agua de bebida. Se midió la presión arterial sistólica (X \pm ES, mmHg) por método indirecto (FA: 132 \pm 2 vs. CA: 108 \pm 4, p< 0.001; FC: 133 \pm 4 vs. CC: 116 \pm 3, n=6, p<0.005). Se analizó la captación «in vitro» de 3H-noradrenalina (NA) en hipotálamo anterior y posterior. Período agudo: la captación neuronal de NA (dpm/ μ g proteína) en el hipotálamo anterior se incrementó en las ratas tratadas (FA: 3.42 \pm 0.32, n=9, vs. CA: 1.98 \pm 0.47, n=10, p<0.02) pero no se encontraron diferencias en el hipotálamo posterior entre animales tratados y sus controles (FA: 2.87 \pm 0.53, n=10, vs. C: 3.01 \pm 0.46, n=11, NS). Período crónico: no hubo diferencias entre grupos en el hipotálamo anterior (FC: 3.21 \pm 0.25, n=10, vs. CC: 3.40 \pm 0.31, n=11, NS); ni en el posterior (FC: 3.93 \pm 0.31, n=12, vs. CC: 3.32 \pm 0.42, n=9, NS). Estos hallazgos sugieren que las variaciones en la captación de NA en el hipotálamo anterior conducirían a un aumento del tono simpático al comienzo del tratamiento con F, pero no estarían involucrados en el mantenimiento a largo plazo del cuadro hipertensivo.

256. (7392) CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ZPA DE OVOCITOS DE BUFO ARENARUM Y SU PARTICIPACIÓN EN PROCESOS TEMPRANOS DE FECUNDACIÓN. SCARPECI, SONIA; SANCHEZ, MERCEDES; CABADA, MARCELO

IBR-CONICET, Fac. de Cs. Bioq. y Farm., UNR, Suipacha 531 (S2002LRK) Rosario, Argentina

Los ovocitos de anfibios están cubiertos por una matriz extracelular que consiste en una estructura definida como envoltura vitelina (EV) y un número de cubiertas gelatinosas. La envoltura de Bufo arenarum es una matriz glicoproteica que confiere a los ovocitos una barrera especie específica para la fecundación así como para la protección de agentes externos. Estudios en otras especies han mostrado que la matriz extracelular de los ovocitos es relevante en los procesos tempranos de fe-

cundación, mediando la unión entre el espermatozoide y el ovocito. Los objetivos del presente trabajo son: clonar la proteína ZPA, uno de los componentes de la EV, y estudiar la participación de cada uno de los componentes de la EV en procesos tempranos de fecundación como la unión a espermatozoides. Para el clonado de ZPA se sintetizó ADNc a partir de ARN de ovario que se usó como molde en reacciones de PCR junto con oligonucleótidos degenerados diseñados por homología de secuencia. En base al producto obtenido se diseñaron cebadores específicos que se usaron, junto con una biblioteca no clonada, para obtener la secuencia completa mediante técnicas de RACE 5' y 3'. En los ensayos de unión las proteínas de la EV fueron marcadas fluorescentemente con FICT y mediante geles preparativos de SDS-PAGE se separaron e incubaron con espermatozoides las 4 especies identificadas de la EV: gp38, gp41, gp75 y gp120; donde los espermatozoides unidos a esta última fueron los únicos que no presentaban fluorescencia. El ADNc para baZPA presenta 2186 pb, con un marco abierto de lectura de 2062 pb, codifica para un polipéptido de 687 aminoácidos con una masa molecular calculada es de 76.789 Da posee además un probable péptido señal en el extremo N-terminal de la proteína, 3 sitios probables de N-glicosilación, y un dominio ZP característico. El ADNc clonado corresponde al homólogo de ZPA para *B. arenarum*. Al atravesar el espermatozoide la EV este posiblemente interactuaría con gp75 gp41 y gp38, no así con gp120

257. (7607) LA PROTEASA BSP66 ESTÁ PRESENTE EN EL ACROSOMA DE VARIAS ESPECIES DE MAMÍFEROS. CESARI, ANDREINA (1); KATUNAR, MARIA ROSA (1); MONCLUS, MARIA ANGELES (2); VINCENTI, AMANDA (2); FORNÉS, MIGUEL WALTER (2)

Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEyN, UNMdP, 7600, Mar del Plata IHEM-CONICET. Área de Histol y Embriol, Depto de Morfol y Fisiol. Fmed. UNCU. CC: 5500, Mendoza.

La fertilización en mamíferos comprende una secuencia de eventos que llevan a la fusión del espermatozoide con las membranas ovocitarias. Se ha descrito que las proteasas están involucradas en una o varias de las etapas de este proceso. Varios autores han realizado una extensa caracterización del sistema proteolítico presente en el acrosoma de espermatozoides de mamíferos, incluyendo las serín proteasas, demostrando que las proteasas acrosomales pueden ser distinguidas en base a su actividad gelatinolítica en SDS-PAGE por su cantidad y variedad. En el presente trabajo se investigó la presencia de la serín proteasa BSp66 en varias especies de mamíferos utilizando anticuerpos heterólogos contra la proteína BSp66 previamente caracterizada en espermatozoides bovinos. Cuando extractos proteicos de espermatozoides de humano, rata y ratón fueron analizados por Westernblot, una proteína de 66 kDa reveló reacción cruzada con los anticuerpos contra BSp66. De acuerdo con estos resultados, por medio de zimografía se detectó actividad proteolítica de una proteína con movilidad electroforética similar a BSp66 en todas las especies analizadas. La proteína fue localizada en la región acrosomal de espermatozoides permeabilizados de humano, rata y ratón por inmunofluorescencia, tal como sea ha descrito para la proteína homóloga descrita en bovinos. La señal fluorescente se pudo observar en espermatozoides de caput y cauda epididimario tanto en rata como en ratón sugiriendo que no es una proteína adquirida durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo. Existe una proteína homóloga a la proteasa de espermatozoides bovinos BSp66 en varias especies de mamíferos. Su peso molecular de 66 kDa es conservado así como su localización en la región acrosomal, constituyendo un miembro más de la familia de serín proteasas acrosomales. La redundancia de los sistemas de proteasas sugieren que las serín proteasas deben tener un rol importante en el proceso de fertilización.

258. (7729) EFECTOS DE LA MICROGLÍA ACTIVADA SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS

PROGENITORAS NEURALES ADULTAS: ROL DEL TGF-BETA. BATTISTA, DANIELA; FERRARI, CARINA; PITOSI, FERNANDO

Fundación Instituto Leloir

En las zonas neurogénicas del cerebro de mamífero se ha descrito la existencia de células progenitoras (NSC) que dan origen a los diferentes tipos de células neurales. La proliferación y diferenciación de las NSC se hallan controladas por señales intrínsecas y extrínsecas a las NSC, mayoritariamente desconocidas. La microglía es un tipo celular residente del cerebro que secreta factores que son tanto citotóxicos como protectivos para las células neurales en general, sin embargo se sabe poco del posible efecto que podrían tener sobre las NSC. El objetivo del trabajo es estudiar la proliferación y diferenciación de NSC del giro dentado (GD) de ratas adultas en un modelo no invasivo de neurogenesis por adrenalectomía en un ambiente de microglía activada y expresión de citoquinas. La adrenalectomía (ADX) provocó un aumento en el número de células BrdU+ (un marcador de división celular) y de células apoptóticas en la capa granular del GD. Se observó un aumento significativo en la proliferación de las NSC (doble marcada para BrdU/nestina) y en la neurogénesis (BrdU/PSA-NCAM). Hemos detectado tres subpoblaciones de NSC con diferente respuesta a la ADX. A su vez, se observó una correlación positiva entre el aumento en la neurogénesis, la activación de la microglía y los niveles para el mensajero del factor transformante de crecimiento beta (TGF- β). Por otra parte, NSC de hipocampo adulto fueron incubadas durante cinco días con TGF- β (1 ng/ml). Se observó un aumento en el número de células con linaje neuronal (células Tuj+) en ambos tratamientos. Hemos caracterizado un modelo de proliferación y diferenciación de las NSC en un entorno donde la microglía se encuentra activada. Este trabajo abre la puerta al estudio de la respuesta anti-inflamatoria sobre la biología de las NSC y es un punto de partida para analizar la utilización de citoquinas en terapias regenerativas del sistema nervioso central.

259. (7800) DIABETES GESTACIONAL: EVALUACION FUNCIONAL DEL ENDOTELIO HUMANO EXPUESTO A ALTA D-GLUCOSA. CORTES, MAGDALENA; JAIME, BEATRIZ; JAIME, SILVANA; VINET, RAUL

Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, CHILE.

Los embarazos complicados por diabetes están asociados a un alto nivel de glucosa en el plasma materno, lo que condiciona alto riesgo obstétrico, conduciendo a macrosomía, sufrimiento fetal y complicaciones metabólicas neonatales. La prevalencia de diabetes gestacional en Chile es un 5%. Estudios in vitro muestran que las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) provenientes de embarazos normales incubadas con 25 mM de D-glucosa simula el efecto de diabetes gestacional sobre la vía L-arginina/óxido nítrico. En el presente trabajo se estudia el efecto de la incubación aguda y crónica de D-glucosa sobre los cambios en la concentración de Ca²⁺ intracelular [Ca²⁺]_i inducida por ATP en cultivo primario de HUVEC. Los purinoceptores expresados en HUVEC son P2X₄, P2X₇, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆. METODOLOGÍA: Las células endoteliales se aislan con colagenasa tipo-I, se cultivan en Medio-199 suplementado, y se identifican por la captación del marcador Dil-Ac-LDL (Molecular Probes) y del anticuerpo antifactor von Willebrand (Prolab) por fluorescencia. La medición de los cambios en la [Ca²⁺]_i (medido como Ft-Fb/Fb) se realiza por la técnica microespectrofluorimétrica (Fluo-3 AM, Molecular Probes), RESULTADOS: (1) Se realizan curvas dosis-respuesta para estudiar el efecto agudo (3min) de alta D-glucosa, observándose que se requiere una mayor concentración de ATP en las HUVEC incubadas con 25 mM de glucosa (CE50: 5,6x10⁻⁵ ± 2,4x10⁻⁵ M; n=15), respecto al control (CE50: de ATP fue de 8,4x10⁻⁶ ± 2,5x10⁻⁶ M; n=15). (2) Se mide el incremento de la [Ca²⁺]_i inducida por ATP (10⁻⁴ M), luego de incubarse 24 hrs las HUVEC con D-glucosa (efecto crónico); observándose un mayor incremento en las

HUVEC incubadas con 25 mM glucosa ($0,94 \pm 0,07$; $n=16$), respecto al control ($0,60 \pm 0,09$; $n=15$). Financiamiento : DIPUV 30/02. Estos resultados muestran que la incubación aguda y crónica con alta D-glucosa modifican la respuesta de HUVEC al ATP.

260. (7846) T3 Y T4 ALTERAN LA FOSFORILACIÓN IN VITRO DE LAS PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS DURANTE EL DESARROLLO. ZAMONER, ARIANE; FRASSON CORBELINI, PATRÍCIA; FUNCHAL, CLÁUDIA; HEIMFARTH, LUANA; SILVA, FÁTIMA REGINA M. B.; PESSOA- PUREUR, REGINA

Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Las hormonas tiroideas T3 y T4 desempeñan importantes funciones en la regulación del desarrollo del sistema nervioso central. Los procesos de crecimiento axonal y dendrítico, la formación de las sinapsis, la mielinización, migración y proliferación celular son reguladas por estas hormonas. Por otro lado, la fosforilación de las proteínas del citoesqueleto, en especial de la de los filamentos intermedios, es un importante mecanismo regulador de procesos tales como el mantenimiento del diámetro axonal y del transporte de sustancias a lo largo de los axones. Numerosos trabajos demostraron que la fosforilación de los filamentos intermedios se encuentra alterada en condiciones patológicas o bien bajo la influencia de algunas drogas, pero poco se sabe sobre el efecto de las hormonas tiroideas T3 y T4 sobre la fosforilación de estas proteínas. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo, fue estudiar el efecto in vitro de T3 y T4 sobre la fosforilación de los neurofilamentos, vimentina y proteína glial fibrilar ácida (GFAP) en corteza cerebral de ratas de 10 y 15 días de vida. Se incubaron slices de corteza cerebral con ((32)P ortofosfato durante 30 minutos en la presencia o ausencia (controles) de T3 (1 μM) o T4 (1 μM). La fracción citoesquelética enriquecida en filamentos intermedios fue obtenida, analizada en SDS-PAGE 10% y las autoradiografías cuantificadas. Los resultados obtenidos demostraron que tanto T3 como T4 indujeron la fosforilación de las proteínas del citoesqueleto en ratas de 10 días, mientras que en ratas de 15 días de edad solo T4 tubo ese efecto. Estos hallazgos sugieren la participación de la fosforilación de las proteínas del citoesqueleto en la respuesta celular a las hormonas tiroideas durante el desarrollo del sistema nervioso central. Además estarían evidenciando un efecto de tipo no genómico rápido sobre el citoesqueleto de las células del sistema nervioso central.

261. (7899) EFECTO DE LA DEFICIENCIA MODERADA DE ZINC SOBRE EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE EN EPIDÍDIMO. GÓMEZ, NIDIA; ZIRULNIK, FANNY; PEREZ CHACA, MARÍA V.; MOLINA, ALICIA; FERNÁNDEZ, MARÍA R.; GIMÉNEZ, SOFÍA

Fac. Qca. Bioquímica y Farmacia, UNSL. Lab. de Qca Biológica - Proyecto 8104 - Fac. de Qca, Bioquímica y Fcia. - UNSL.

Introducción: Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron alteraciones histológicas en epidídimo, incremento de lipoperoxidación (TBAR'S), disminución de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa y catalasa y oxidación proteica, como consecuencia de una deficiencia de Zinc crónica. Objetivos: Continuar el estudio de parámetros que participan en la defensa antioxidante frente al estrés producido por la deficiencia de Zn, en particular: glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD), glutatión total (Gt) y tioles no proteicos (TNP). Materiales y Métodos: Ratas Wistar (200-250g) se separaron en 2 grupos: Control(Co) alimentadas con dieta AIM- 93M (30 mgZn/ kg) y Deficiente en Zn (DZ) con la misma dieta pero con una concentración de Zn de 5mg/kg. A los dos meses, fueron sacrificados los animales y se removieron los epidídimos, separándose cabeza y cola. Las actividades enzimáticas de GR y SOD fue-

ron realizadas según Schaedle y col.(1977) y Beauchamp y Fridovich (1971), respectivamente. Glutatión total según Akerboon (1981) y tioles no proteicos según Lou y col.(1987). Resultados: GR: Co cabeza $0,54 \pm 0,09$ y cola $1 \pm 0,19$ $p < 0,05$; DZ cabeza $0,64 \pm 0,08$ y cola $1,21 \pm 0,17$ mM NADPH/g. tej. $p < 0,01$, cuando comparamos cabeza Co y DZ y cola Co y DZ no se observaron diferencias significativas. SOD: cabeza Co $2,8 \pm 0,3$ y DZ $5,3 \pm 0,6$ $p < 0,01$, cola Co $1,52 \pm 0,3$ y DZ $2,59 \pm 0,5$ UI/mg. prot. $p < 0,05$ y entre cabeza y cola DZ $p < 0,05$. Gt: Co cabeza $0,6350 \pm 0,06$ y cola $0,973 \pm 0,03$ $p < 0,05$; DZ cabeza $1,075 \pm 0,05$ y cola $1,056 \pm 0,09$ $\mu\text{M/g}$ tej. ns, siendo significativas las diferencias entre Co y DZ para cabeza $p < 0,05$. TNP: Co cabeza $46,17 \pm 0,17$ y cola $54,78 \pm 0,24$ y DZ cabeza $54,59 \pm 0,51$ y cola $66,87 \pm 0,35$ mM DTNB/ g. tej., ns. Conclusión: Los resultados sugieren un estrés oxidativo leve, donde algunos parámetros marcadores de estrés oxidativo y de defensa antioxidante han modificado sus niveles, mientras que otros probablemente requieran de mayor tiempo para manifestarse.

262. (7953) COMPLEXINA PARTICIPA EN LA REACCIÓN ACROSOMAL. DE BLAS, G; BRANHAM, T; ROGGERO, M; LÓPEZ, C; TOMES, CN; BELMONTE, S; MAYORGA, LS

Lab. Biol. Cel. Mol. IHEM-CONICET. Fac. Cs. Méd. UNC

La reacción acrosomal es un proceso exocítico regulado calcio dependiente, esencial para la fecundación, en el que la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan masivamente. Nuestro laboratorio ha acumulado una importante cantidad de información relativa al rol de proteínas fusogénicas durante la mencionada exocitosis. Uno de los nuevos factores que se están ensayando son las complexinas. Estas son pequeñas proteínas citosólicas, altamente conservadas, que se une al complejo SNARE ensamblado en la superficie del surco formado entre sinaptobrevina y sintaxina. Esta interacción modula la sensibilidad al calcio del complejo SNARE, regulando de esta forma la exocitosis después del ensamblado de los SNAREs. En nuestros experimentos empleamos muestras de espermatozoides humanos de donantes normales (OMS), recuperados del swim-up, ajustados a una concentración de 7×10^6 células/ml (medio de cultivo GPM, Serono). Nuestros ensayos utilizando un anticuerpo que reconoce complexina I y II muestran que estas proteínas están presentes en espermatozoides humanos, y se ubican en la región acrosomal de la célula. Por otra parte, en ensayos funcionales de reacción acrosomal estimulada por calcio en células permeabilizadas con estreptolisina-O, complexina II recombinante - expresada como proteína de fusión con GST - y el anticuerpo anti complexina I y II inhiben en forma dosis-dependiente la exocitosis acrosomal. Estos resultados indican que las complexinas (probablemente la tipo II) cumplen un papel fundamental en la exocitosis acrosomal probablemente modulando la interacción entre SNAREs presentes en la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática

263. (8073) IMPLICANCIA DE C-FOS CITOPLÁSMICO EN EL CRECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO DE RATA. FERRERO, GABRIEL O.; CAPUTTO, BEATRÍZ L.

CIQUIBIC - Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, U.N.C, Córdoba, Argentina

c-Fos es el producto proteico del gen de expresión temprana c-fos. Esta proteína actúa como factor de transcripción, forma dímeros con miembros de la familia c-jun, constituyendo así la familia de factores de transcripción tipo AP-1. La expresión de c-Fos se encuentra altamente regulada en las células, no siendo un elemento constitutivo de las mismas. Su sobre expresión puede conducir a la transformación celular. En nuestro laboratorio se ha determinado, en distintas líneas celulares, que c-Fos citoplásmico se asocia al retículo endoplásmico(R.E.) y activa la síntesis de fosfolípidos, tanto in vitro como in vivo. Esta actividad es independiente de su actividad como factor de transcrip-

ción tipo AP-1. En el presente trabajo se quiso examinar este fenómeno in vivo en cultivos primarios de células neuronales, para establecer si c-Fos cumple un rol en el desarrollo neuronal normal se realizaron cultivos primarios de neuronas de hipocampo de embrión de rata de 18 días de gestación. Se encontró c-Fos asociado a R.E. y concomitantemente una activación de la síntesis de fosfolípidos, lo cual concuerda con lo observado previamente en líneas celulares. Se quiso conocer si este fenómeno de activación de fosfolípidos por c-Fos también se observa en una situación in vivo. Para ello, examinamos la expresión de c-Fos por inmunohistoquímica en cortes de cerebro de ratas de diferentes edades, se observó una disminución en la expresión de c-Fos medida que aumenta la edad de los animales. Mediante microscopía confocal se estableció que cuando se c-Fos se encuentra expresado la proteína colocaliza con marcadores de Retículo Endoplásmico y con marcadores del Aparato de Golgi.

BIOTECNOLOGÍA

264. (7317) DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UN CONTROL INTERNO (CI) ESTABLE PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS C (HCV) POR RT-PCR. VILLANOVA, VANINA; GARDIOL, DANIELA; GIRI, ADRIANA

Área Virología, IBR-CONICET, FCBy F, UNR

El HCV es el principal causante de las hepatitis no-A no-B. El 75 % de los individuos infectados presentan infecciones crónicas que pueden progresar a cirrosis y hepatocarcinoma. HCV es un virus a ARN (+) y se transmite principalmente por vía parenteral. Desde 1990, los países desarrollados han implementado métodos moleculares como técnicas de diagnóstico lo que ha contribuido a disminuir la incidencia de la infección. La inclusión de un CI que permita verificar la eficiencia del procedimiento completo es un requisito necesario para la implementación de dichos métodos moleculares. En este trabajo desarrollamos un CI estable para ser incorporado en un método de detección de HCV por RT-PCR y la ulterior estandarización del procedimiento. El CI es un fago con genoma ARN (+) en el cual se han incorporado las secuencias nucleotídicas de los cebadores KY78/80 utilizados para la detección HCV. Es resistente a ARNasas, estable a 4°C al menos 585 días y puede ser co-amplificado con muestras HCV (+). Una dilución del CI se adiciona a la muestra, se co-extraen los ARN de ambos virus y se co-amplifican. La extracción se realiza a partir de 100 µl de plasma con tiocianato de guanidina, precipitación con alcoholes y resuspensión en 100 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato. 10 µl de ARN son usados para la RT-PCR donde uno de los cebadores está biotinilado en el extremo 5'. Los amplicones obtenidos a partir de HCV y del CI, son detectados por hibridación con sondas específicas: 5 µl del amplificado son utilizados para la hibridación en fase líquida con las sondas conjugadas a fluoresceína, en tubos separados. Finalmente los híbridos se capturan en microplacas cubiertas con estreptavidina, se detectan con un anticuerpo anti-fluoresceína y reacción colorimétrica. El límite de detección estimado para este método de diagnóstico de HCV es de 278 UI/ml. El presente ensayo cumple con los requisitos del Consenso Nacional Argentino sobre Hepatitis C, y podría ser evaluado para su uso en Bancos de Sangre de nuestro país.

265. (7356) USO DE UN PÉPTIDO RICO EN ARGININA PARA TRANSPORTAR PROTEÍNAS AL CITOPLASMA. LÓPEZ, CECILIA INÉS; MAYORGA, L. S.

Lab. Biol. Cel. y Molec. IHEM-CONICET, Fac. de Cs. Méd., UNCuyo

Existen péptidos ricos en arginina que tienen la propiedad de ingresar al citoplasma de las células por un mecanismo independiente de endocitosis, de la vía de las caveolas y de ATP. Estos péptidos pueden usarse como vehículo para transportar al cito-

plasma proteínas unidas covalentemente. El transporte de proteínas exógenas al citosol es útil para estudiar su función en células en que no puede utilizarse la transfección, como por ejemplo los espermatozoides que son transcripcionalmente inactivos. Para producir proteínas recombinantes permeables se diseñó el plásmido pGEX-2T-R a partir de pGEX-2T. Este plásmido codifica la proteína glutatión-S-transferasa unida al péptido RRRQRKRKRQ en su extremo C-terminal. La proteína GST-R se obtuvo a partir de cultivos de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con pGEX-2T-R. Luego se realizaron ensayos de permeabilidad de GST-R en células CHO y en espermatozoides humanos. Se incubó las células durante tres horas con GST-R o con GST y luego se visualizó por inmunofluorescencia indirecta. En otro ensayo similar se utilizaron las proteínas marcadas con rodamina. En ambos casos GST-R ingresó a las células mientras que GST no. Para determinar si este método podía utilizarse para ensayos funcionales se subclonó rab3AQ81L unida al péptido rico en arginina (R-rab3A) en el plásmido PQE80L. Debido a que Rab3A estimula la reacción acrosomal en espermatozoides permeabilizados, era de esperarse que R-rab3A tuviera un efecto similar en espermatozoides no permeabilizados. En los ensayos de reacción acrosomal realizados en espermatozoides intactos R-rab3A estimuló la reacción acrosomal (68,7%+/-31,2), mientras que Rab3A no (11,1%+/-11,1). En ensayos posteriores realizados con ciclodextrina, ciclodextrina-colesterol y anfotericina se observa que la función de Rab3A es regulada de la misma manera en espermatozoides intactos tratados con R-rab3A que en espermatozoides permeabilizados tratados con Rab3A no permeable. Los péptidos ricos en arginina se pueden utilizar para estudiar la función de proteínas en espermatozoides intactos.

266. (7440) PRODUCCIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO DE PEJERREY EN CULTIVOS BACTERIANOS. APLICACIONES EN PISCICULTURA. SCIARA, ANDRÉS; SOMOZA, GUSTAVO (1); ARRANZ, SILVIA

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET). Fac. de Cs. Bioq. y Farm. UNR. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH). Chascomús. Bs As.

El pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonaerensis*) es un pez autóctono cuya calidad de carne y mercados de venta lo hacen interesante para su explotación comercial. Si bien se ha trabajado en el cultivo del pejerrey, aún no se han obtenido tasas de crecimiento adecuadas para su cultivo intensivo. En numerosas especies de peces se ha demostrado que el suplemento de la alimentación con Hormona de Crecimiento (GH) incrementa la velocidad de crecimiento de los mismos. El objetivo del siguiente trabajo es producir GH de pejerrey recombinante (pjGHR) en sistemas bacterianos para su uso en acuicultura y generar ensayos in-vitro para la evaluación de su actividad. Para ello se obtuvo por técnicas de RT-PCR la secuencia que codifica para la proteína madura de pjGH y subclonó en un vector pET-24 transformando con el mismo una cepa de *E. Coli* BL21 modificada para producción de proteínas recombinantes con alta eficiencia induciendo con Lactosa. Mediante lisis celular en French Press y centrifugación se obtuvo la proteína en cuerpos de inclusión (CI), ésta representa un 26% del peso seco de las células. El rendimiento alcanzado es de aprox. 0,5 gs de pjGHR cada litro de cultivo. Por SDS-PAGE y análisis densitométrico se determinó que los CI tenían un 78% de pureza, aumentando a un 83% luego del lavado. Con el propósito de tener herramientas para evaluar el nivel de GH en plasma (ELISA) se generaron anticuerpos contra pjGH (AcGH). Análisis de extractos de hipófisis por Western Blots sumado a inmuno-histoquímicas en cortes de hipófisis muestran la especificidad de los AcGH. Se puso a punto una PCR semicuantitativa para evaluar la actividad biológica de la pjGH midiendo la expresión del factor de crecimiento IGF-I en cultivos primarios de hepatocitos de pejerrey. Logramos obtener la pjGHR con altos rendimientos y pureza sin métodos costosos de purificación. Se generaron además herramientas para la detección de la actividad de la pjGHR in vitro y su concentración plasmática.

267 (7454) CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA VARIANTE ACORTADA DE GLUTAMATO DECARBOXILASA HUMANA. ANTÓN, ERICA ANDREA; BURGARDT, NOELIA I.; OLIVERA, FRANCISCO; ERMÁCORA, MARIO R.

Universidad Nacional de Quilmes

De las dos formas homólogas de la glutamato decarboxilasa humana, GAD65 y GAD67, solamente GAD65 es un blanco común de autoinmunidad. Esta proteína es de gran interés biotecnológico y biomédico. En este trabajo se inició la caracterización estructural de la glutamato decarboxilasa y se utilizó una variante acortada: $\Delta(1-69)$ M161TGAD (que carece de los primeros 68 residuos). La variante conserva el sitio catalítico y el mapa casi completo de epítopos conformacionales. El volumen hidrodinámico de la proteína se estudió por exclusión molecular analítica. La estructura secundaria y terciaria se analizaron por difracción circular (CD). Se estudió el entorno de los triptofanos por fluorescencia. La estabilidad se analizó siguiendo el cambio en la elipticidad a 220 nm vs temperatura. En el experimento de SEC-FPLC, $\Delta(1-69)$ M161TGAD se comportó como una proteína compacta. Los espectros de CD en el UV lejano muestran una disposición de máximos y mínimos característica de una proteína con alto contenido de estructura de α -hélice de acuerdo con lo divulgado para GAD de otras especies. El espectro obtenido para $\Delta(1-69)$ M161TGAD en el UV cercano corresponde a la existencia de estructuras rígidas y perfectamente empaquetadas en el entorno de los residuos aromáticos, típicas de una proteína correctamente plegada. Para poder estimar la capacidad calorífica a presión constante, ΔC_P , en el proceso de desnaturalización, el experimento se realizó a tres valores de pH. La desnaturalización térmica fue altamente cooperativa. El espectro de la emisión de fluorescencia de triptofanos exhibió una longitud de onda λ_{MAX} de 326 nm, lo que muestra un estado compacto en el entorno de la mayoría de los residuos de Trp. Cuando $\Delta(1-69)$ M161TGAD fue transferida a una solución de cloruro del guanidinio 5 M, el máximo de la emisión de la fluorescencia cambió a 356 nm, acorde a una conformación no nativa, con un aumento del decaimiento no radiativo de la fluorescencia.

268. (7624) DETECCIÓN PRECOZ DEL CÁNCER CERVICAL: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN ENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) ONCÓGENICOS. CHOUHY, DIEGO; BENITEZ GIL, LISANDRO; NOCITO, ANA L.; CITTADINI, JORGE; GARDIOL, DANIELA; GIRI, ADRIANA A.

Area Virología, IBR (CONICET), FbioyF (UNR), Rosario, Argentina.

Los HPV oncogénicos, en particular los tipos 16, 18, 31 y 33 se encuentran asociados a la mayoría de los carcinomas de cuello de útero. La infección con HPV de tipos oncogénicos es el evento clave en el desarrollo del cáncer cervical. Si bien el Papanicolaou (Pap) redujo notablemente la incidencia de cáncer cervical, se siguen registrando casos de neoplasias cervicales en mujeres controladas con el Pap, lo que indicaría que se llegó al límite de sensibilidad de esta metodología. Por ello, disponer de un ensayo molecular para la detección de HPV oncogénicos facilitaría el diagnóstico precoz del cáncer cervical. Aquí presentamos el desarrollo del L1HPVPCR, un ensayo basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con revelado colorimétrico para la detección y tipificación de los HPV oncogénicos. El ensayo presenta las siguientes características: i) amplificación de una porción de L1 de HPV con los cebadores MY11 y MY09 biotinilado; ii) hibridación líquida del amplicón biotinilado a una sonda genérica conjugada con fluoresceína; iii) captura de los híbridos a una microplaca revestida con estreptavidina; iv) detección con anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa y un cromóforo; v) lectura de absorbancia en lector de microplacas; vi) tipificación de las muestras HPV-positivas con sondas específicas para HPV-16, -18, -31 y -33. El L1HPVPCR optimizado resultó ser reproducible, sensible (1×10^{-3} copias de HPV/célula), específico, de fácil ejecución y de bajo

costo. Para convalidar la aplicabilidad de la técnica para el diagnóstico se analizaron 73 muestras de cepillado cervical. El ADN viral fue encontrado en el 64% (47/73) de éstas y tipificado en el 53% (25/47). Estos resultados, comparados con el Pap, indican al L1HPVPCR como un sistema de mayor sensibilidad para la identificación de pacientes a riesgo de desarrollar cáncer cervical.

269 (7837) ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPOS QUE RECONOCEN ESTRUCTURAS RELACIONADAS AL DISACÁRIDO DE THOMSEN-FRIEDENREICH SON GENERADOS A PARTIR DE LA LECTINA DE AGARICUS BISPORUS. SENDRA, VICTOR; NORES, GUSTAVO A.; IRAZOQUI, FERNANDO J.

CIQUIBIC-CONICET / Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, U.N.C., Córdoba

Oligosacáridos de las cadenas de O-glicanos de mucinas están frecuentemente sobre-expresados y aberrantemente glicosilados en células de tumores epiteliales. El core 1 (Galbeta1-3GalNAcalpha-O-) de O-glicanos tipo mucinas, también llamado disacárido de Thomsen-Friedenreich (TFD), es un ejemplo de estructuras crípticas que se sobreexponen en células tumorales debido a modificaciones en el perfil de sus glicosiltransferasas. La lectina de *Agaricus bisporus* (ABL), reconoce principalmente a TFD, con características inhibitorias de la proliferación de células de tumores epiteliales. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar anticuerpos anti-idiotipos con la intención de conseguir una respuesta inmune que revele una especificidad de reconocimiento similar a ABL. Con este propósito se realizó una purificación por cromatografía de afinidad de ABL, para utilizar esta lectina como primer molde en la generación de anticuerpos. Se inmunizaron conejos con ABL, generando altos títulos de anticuerpos que fueron cuantificados por ELISA. Luego se purificaron IgG no inmune y anti-ABL mediante la utilización de Proteína G-sepharosa. La fracción de IgG anti-ABL fue ofrecida a una columna cromatográfica de ABL-sepharosa para purificar la fracción específica de IgG anti-ABL. Estas IgGs fueron utilizadas como inmunógenos de ratones, a los que se les estudió la respuesta inmune humoral. Los anticuerpos así obtenidos (IgG e IgM) fueron capaces de reconocer glicoproteínas secretadas por la línea tumoral T47D. Esta interacción fue inhibida por estructuras relacionadas a TFD. Estos anticuerpos también mostraron un mayor título de anticuerpos anti-células tumorales (T47D y HT29) que los controles, e inhibidos parcialmente por moléculas relacionadas a TFD. La utilización de ABL como primer molde en la generación de anticuerpos anti-idiotipos es una alternativa válida como variante estratégica en la generación de anticuerpos que reconocen estructuras relacionadas a TFD.

270. (7882) MAPEO DE PROPIEDADES MECÁNICAS DE UN BIOSENSOR MEDIANTE MICROSCOPIA Y ESPECTROSCOPIA DE FUERZA. LUDUEÑA, S.J.; FLEXER, V. (2); CESA, Y. (3,1); CALVO, E. J. (2); PIETRASANTA, L.I.

Centro de Microscopías Avanzadas; Lab. Electroquímica Molecular, Lab. Electrónica Cuántica, FCEyN-UBA

Un biosensor es un dispositivo al que se le incorpora una biomolécula con el propósito de medir de manera selectiva la presencia de un compuesto determinado. Este dispositivo traduce el cambio químico de la biomolécula en una señal eléctrica procesable. El objetivo del trabajo es caracterizar mediante microscopía y espectroscopía de fuerza, un biosensor amperométrico-enzimático basado en la presencia de la proteína redox glucosa oxidasa (GOx). El sistema en estudio está compuesto por electrodos modificados con capas alternadas de polialilamina modificada con un complejo de osmio (PAH-Os) y GOx. Para su construcción se utilizó la técnica de películas autoensambladas por adsorción electrostática capa por capa. Esta técnica permite variar la distribución espacial de la enzima y el polímero de ma-

nera controlada variando el pH de las soluciones de PAH-Os. Las características mecánicas del sistema fueron estudiadas mediante espectroscopía de fuerza, la cual permite obtener un mapa de alta resolución de propiedades tales como elasticidad, adherencia y densidad de carga de una muestra colectando un conjunto de curvas de fuerza en distintos puntos de la superficie. Utilizando microscopía de fuerza atómica (AFM) observamos cambios en el espesor y la morfología global del biosensor al modificar la densidad de carga lineal del polímero durante el autoensamblado. Estos resultados se correlacionan con los cambios en el espesor observados mediante elipsometría y en la respuesta electrocatalítica del biosensor a la glucosa determinados mediante voltametría cíclica de barrido. El análisis de las curvas de fuerza obtenidas mediante AFM nos permitió obtener un mapa de las propiedades mecánicas de la muestra con una resolución lateral y vertical del orden de los nanómetros y una sensibilidad del orden de los piconewtons. Los resultados obtenidos sugieren que la microscopía y espectroscopía de fuerza constituyen una herramienta valiosa para el estudio y caracterización de ensamblados macromoleculares.

271. (7918) DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CULTIVO PRIMARIO DE GLÁNDULA MAMARIA BOVINA. SU UTILIZACIÓN EN EL ANÁLISIS DEL ARNI COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA CALIDAD DE LA LECHE DE VACA. CHANETON, LUCIANO (1); PÉREZ SÁEZ, JUAN MANUEL (2); MEDINA, MARIANO (1); BARAÑAO, LINO (2); BUSSMANN, LEONARDO (2)

Goyaíke SA; Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET

En la generación de animales genéticamente modificados se presenta como ideal la evaluación in vitro de la efectividad de la alteración a realizar. En el caso de modificaciones dirigidas al mejoramiento de la leche de vaca, esta evaluación es especialmente difícil dada la imposibilidad de mantener, en cultivo celular, la expresión de proteínas lácteas a lo largo de las divisiones o luego del congelamiento. Nuestro objetivo fue desarrollar un sistema de cultivo que permita el estudio de las alteraciones genéticas destinadas a mejorar la calidad de la leche. Para esto cultivamos células de acinos mamarios en presencia de medios modificados obteniendo más de 30 divisiones, mientras que con medios convencionales tan solo 6.5 ± 0.6 ($p < 0.01$). El mantenimiento de la diferenciación celular fue corroborado en la división 20 por inmunocitofluorescencia y RT-PCR observándose la expresión de β -caseína y β -lactoglobulina. Estas células resultaron ser susceptibles a métodos químicos de transfección lo cual fue demostrado por tratamiento con lípidos catiónicos y expresión de genes reporteros. Por último se analizó la utilidad de este sistema para el estudio del ARN de interferencia (ARNi) como herramienta para silenciar la expresión de proteínas lácteas. Para esto se utilizaron vectores de expresión capaces de transcribir horquillas de ARN complementarias a 6 regiones diferentes del ARN mensajero (ARNm) de β -caseína. Los ensayos de transfección realizados dieron como resultado una disminución de la expresión de β -caseína tanto a nivel de la expresión proteica como de ARNm para 2 de las construcciones utilizadas. Los resultados antes mencionados indican la utilidad de nuestro sistema para el análisis a nivel molecular de modificaciones genéticas destinadas a mejorar la calidad nutricional de la leche y sugieren como factible la utilización de la técnica de ARNi para dicho fin.

272. (8050) DIFUSIÓN DE GLUCOSA EN HIDROGELES CONFINADOS EN MEMBRANAS MACROPOROSAS. HIDALGO, ROMINA; SMOLKO, EDUARDO E.; ARGIBAY, PABLO; GRASELLI, MARIANO

Universidad Nacional de Quilmes; Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA); ICBME, Hospital Italiano

En el desarrollo de un dispositivo de hígado bioartificial es necesario dos componentes fundamentales: uno biológico, com-

puesto por acumulo de células hepáticas, y otro sintético, que contiene a dichas células. El sistema sintético, compuesto de un sistema de membranas debe favorecer el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular, y permitir el intercambio entre las células y el paciente, de las sustancias sintetizadas y/o detoxificadas. El objetivo de trabajo consistió en la obtención de un nuevo material filtrante en base a hidrogeles. Como soporte se utilizó membranas de fibra hueca de polisulfona macroporosas. El hidrogel confinado dentro de esta estructura se obtuvo mediante la polimerización in situ de una solución de composición de monómeros precisa. La reacción de polimerización se inició por irradiación gamma de Co60, lo que permite obtener un hidrogel homogéneo. Se estudiaron dos combinaciones de monómeros capaces de generar hidrogeles: Acrilamida/Bisacrilamida (AAm/BAAm) 0,9M/0,05M, Hidroxietilmetacrilato/Dietilenglicoldimetacrilato (HEMA/DEGDMA) 0,9M/0,05M. La incorporación y formación del hidrogel en la estructura de la membrana se confirmó por espectroscopía infrarroja de las muestras deshidratadas. La formación de un hidrogel homogéneo se confirmó debido a la ausencia de permeabilidad al agua. Se construyó un sistema de recirculación soluciones termostatazadas de flujo controlado para realizar determinaciones de constantes de permeabilidad de diferentes biomoléculas. Se obtuvieron resultados de la permeabilidad de la glucosa a 37°C. El hidrogel compuesto de AAm/BAAm mostró una permeabilidad de 10 veces superior al sistema de HEMA/DEGDMA para la misma concentración molar de monómeros y la misma relación molar monómero/entrecruzante. Se logró la formación in situ de un hidrogel con una composición definida, confinado en un sistema macroporoso. Fue posible la determinación de la permeabilidad de glucosa. La estructura química de los polímeros formados afecta de manera diferencial a la difusión.

273. (8097) IMPLANTE DE EPITELIO ANTERIOR CORNEA CULTIVADO IN VITRO PARA EL TRATAMIENTO DE DESORDENES SEVEROS DE LA SUPERFICIE OCULAR. ESTUDIO PRE-CLINICO. ROLDÁN, FERNANDO (1); LUENGO, FEDERICO (2); CORREA, LAURA (1); PRIEGUE, CAROLINA (1); GALLO, JUAN (2)

(1) Craveri S.A.I.C.; (2) Hospital Austral

Antecedentes: La córnea esta compuesta por tejidos avasculares que son altamente diferenciados y estructurados que permiten la refracción y la transmisión de la luz. La superficie de la córnea se compone de un epitelio estratificado escamoso no queratinizado, tiene stem cells en la zona límbica que son la fuente de las nuevas células epiteliales que aseguran su constante renovación. La cornea esta expuesta a enfermedades severas de la superficie ocular, el factor común de todas ellas es el daño y la desaparición de la población de stem cells de la zona límbica, llevando al crecimiento del epitelio conjuntival, la vascularización y por último la opacificación de la córnea. Objetivos: Nos propusimos poner a punto el cultivo in vitro de stem cells de la zona límbica sobre diferentes soportes para obtener una lámina epitelial estratificada y realizar el posterior implante para el tratamiento de lesiones irreversibles de la superficie ocular. Materiales y Métodos: Con el objeto de obtener células del epitelio anterior de la córnea se tomaron muestras mínimas de 1,5 mm de diámetro de la zona límbica en el cuadrante superoexterno en conejos blancos Neocelandeses. Las células fueron expandidas sobre capas nutricias de fibroblastos irradiados letalmente y montadas sobre diferentes soportes (plasma, fibrina, poliestireno y policarbonato). Se examinaron las propiedades del epitelio ingenierizado mediante ensayos macroscópicos y microscópicos. Posteriormente se realizaron implantes en conejos que previamente habían sido sometidos a lesiones en la cornea. Se realizaron a distintos tiempos controles clínicos del implante y estudios histopatológicos. Los implantes mostraron una marcada transparencia. No hubo signos de rechazo. Observamos que es posible la formación de láminas de epitelio anterior de córnea a partir de muestras mínimas, utilizando como soporte fibrina o plasma.

CARDIOVASCULAR, RESPIRATORIO Y RENAL 3

- 274. (6959) RITMOS ULTRADIANOS Y CIRCADIANO DE PRESIÓN ARTERIAL EN PACIENTES NORMOTENSOS E HIPERTENSOS «DIPPER» Y «NON-DIPPER».** PÉREZ-LLORET, SANTIAGO; GARCÍA AGUIRRE, ALEJANDRO; CARDINALI, DANIEL P.; TOBLLI, JORGE E.

Lab. de Neurofisiología, Fac. de Medicina, UBA; Sección Hipertensión Arterial, Htal. Alemán.

Se conoce la existencia de ritmos ultradianos (período < 24 hs) y circadianos en la presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC). Aquellos pacientes que presentan una caída nocturna de la PA < 10% de la PA diurna son conocidos como «non-dipper» y presentan mayor riesgo de daño a órgano blanco. Los objetivos de este estudio fueron, analizar la integridad de dichos ritmos en pacientes hipertensos «dipper» (n= 100) y «non-dipper» (n= 20) y compararlos con los ritmos observados en 44 pacientes normotensos. Para ello, se utilizó análisis de Fourier para identificar los ritmos ultradianos (de 12, 8 y 6 hs) y circadiano en las mediciones ambulatorias de presión arterial (MAPA) de los pacientes enrolados. Se calculó la media diaria (mesor), la amplitud y la acrofase de cada uno de los ritmos y del ritmo resultante de la adaptación de todos los ritmos. Todos los pacientes mostraron ritmos significativos de PA y FC. Se observó un aumento del mesor de PA sistólica y diastólica en los pacientes hipertensos. El porcentaje de la variabilidad observada en la PA que pudo ser explicada por la existencia de ritmos ultradianos y circadiano fue menor en los pacientes hipertensos «non-dipper» en relación a los «dipper» y normotensos. La amplitud de los ritmos aumentó en los pacientes «dipper» y se redujo en los «non-dipper» en comparación con los normotensos. No se hallaron alteraciones en las características de los ritmos de FC. En los pacientes hipertensos «non-dipper» se observa pérdida de la integridad de los ritmos ultradianos y circadiano de PA que acompaña a la ya conocida pérdida de la caída fisiológica de la PA durante el sueño.

- 275. (7131) DEFICIENCIA DE ZINC DURANTE EL CRECIMIENTO: EFECTO DE LA SUPLEMENTACION SOBRE EL SISTEMA DEL OXIDO NITRICO VASCULAR.** COSTA, MA; TOMAT, A; ELES GARAY, R; GIRGULSKY, L; TESOLIN, E; WEISSTAUB, A; BALASZCZUK, AM; ARRANZ, C

Fac. Farmacia Y Bioquímica, UBA. Iquimefa-CONICET

La regulación de la presión arterial está estrechamente relacionada con la integridad del endotelio vascular cuya funcionalidad depende, en parte, de niveles adecuados de Zn²⁺. El Zn²⁺ es un componente estructural de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Objetivo: evaluar la presión arterial sistólica (PAS, mmHg) y la actividad de NOS en aorta, en dos grupos de ratas que recibieron durante el crecimiento (desde el destete y durante 2 meses): Dieta control (DC: 30 ppm Zn²⁺, n=8) ó Dieta deficiente en Zn²⁺ (DB: 8 ppm Zn²⁺, n=8). Al finalizar este período 4 animales de cada grupo fueron sacrificados y se determinó la actividad NADPH-diaforasa y la actividad de NOS (pmol/g de tejido) con L-[U14C]-arginina luego del agregado de carbacol (1µM). Los animales restantes de cada grupo recibieron durante 2 meses dieta suplementada (60 ppm Zn²⁺) y fueron sacrificados para realizar las determinaciones antes citadas. Al finalizar el primer período experimental (60 días) el grupo DB presentó una mayor PAS con respecto a DC, que se mantuvo luego de la suplementación (120 días) (15° día del destete=111±5vs 107±6, NS; 60 días =145±8vs121±4, p<0.01; 120 días =143±6vs126±5, p<0.01, respectivamente). La actividad NADPH-d en endotelio de aorta fue menor en DB con respecto a DC, manteniéndose estas diferencias luego de la suplementación (60 días=0.198±0.010 vs 0.263±0.013, p<0.01; 120 días=0.190±0.012 vs 0.255±0.016, p<0.01, respectivamente). La actividad de la NOS no mostró diferencias después de los dos meses de suplementación con respecto a los 60 días (60 días =272.9±10.2 vs 390.4±19.6, p<0.01; 120 días =

259.2±17.5 vs 356.1±26.8, p<0.01, respectivamente). El aumento de la presión arterial observado en la deficiencia de Zn²⁺ durante el crecimiento estaría mediado al menos en parte por una disminución en la actividad de sistema del NO. Tanto los niveles de PAS como la disminuida actividad de NOS inducidas por la deficiencia no revirtieron luego de dos meses de suplementación.

- 276. (7182) RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD MECÁNICA CON LA PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE NO EN CORAZÓN DE RATAS HIPÓXICAS Y NORMÓXICAS.** LA PADULA, PABLO(1); ZAORBORNÝ, TAMARA(2); VALDEZ, LAURA(2); BOVERIS, ALBERTO(2); COSTA, LIDIA E.(1)

(1) Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; (2) Laboratorio de Radicales Libres en Biología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

El NO tiene un rol modulador de la contractilidad cardíaca que es dependiente de la concentración y de la isoenzima involucrada. La adaptación del miocardio a la hipoxia estaría asociada a una menor declinación en su capacidad contractil con la edad y a un aumento de la mtNOS. En ratas sometidas a 53.8 kPa en cámara de hipopresión durante 1, 10, 26, 45 y 74 semanas y en sus respectivos controles a 101.3 kPa se determinaron los parámetros de actividad mecánica en músculo papilar en condiciones isométricas y la actividad de NOS, por el método de la oxihemoglobina, en mitocondrias aisladas de ventrículo izquierdo. Este mostró una leve hipertrofia (18-34%) durante la hipoxia en comparación con la del ventrículo derecho (106-123%). Durante la adaptación la tensión desarrollada (TD), la máxima velocidad de contracción (+T) y de relajación (-T) aumentaron 34-67% y la relación TD/TR, calculada como estimación del ajuste a la ley de Frank-Starling, se incrementó un 87% respecto a los controles, mientras que -T/+T no cambió. A las 74 semanas las diferencias entre los grupos se anularon. TD, +T y -T mostraron una correlación bifásica con la actividad de mtNOS, definiendo una producción óptima de NO en 0.7 nmol/min.mg proteína, correspondiente a ratas jóvenes (2 meses), a partir de la cual se calculó la concentración mitocondrial óptima de NO en estado estacionario. Conclusión: El beneficio del aumento en la producción mitocondrial de NO en la hipoxia hipobárica crónica sobre la función del músculo cardíaco estaría limitado por un efecto inotrópico y lusitrópico negativo a concentraciones mitocondriales de NO superiores a 1.6 µM.

- 277. (7183) PAPEL DE LOS RECEPTORES IMIDAZÓLICOS Y ALFA-2D ADRENÉRGICOS SOBRE LOS EFECTOS CENTRALES DE LA AGMANTINA EN LA PRESIÓN ARTERIAL.** PUENTES, MARIA NOEL; DATTILO, MELINA; CREMASCHI, GRACIELA (1); BIANCIOTTI, LILIANA (2); VATTA, MARCELO

Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA (1) CEFYBO-CONICET (2) Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA

La agmantina (Agm), ligando endógeno de los receptores imidazólicos, disminuye la presión arterial (PA) a nivel central, mostrando una primera fase independiente y una segunda dependiente de la vía del óxido nítrico. Continuando con estos estudios el objetivo del presente trabajo fue investigar los mecanismos por los que la Agm disminuye la PA y los efectos sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS). Se utilizaron ratas Sprague-Dawley (250-300g) a las que se implantó una cánula en el ventrículo cerebral lateral (ICV) y 5 días después se inyectó por esta vía Idazoxan (IDX) 25 µg/ml (bloqueante imidazólico) y RX821002 6nM (bloqueante alfa-2D adrenérgico) en presencia o ausencia de distintas dosis de Agm. A otro grupo se inyectó con Agm (0,2 ng/ml) para determinar la actividad de NOS en bulbo raquídeo. Los resultados se expresan como % (ANOVA y test de Bonferroni, *p<0.05; n:4-6). El IDX no

mostró efecto sobre la PA hasta los 45 minutos, a partir del cual aumentó la PA hasta el final del experimento (20%*). El efecto hipotensor de la Agm en presencia de IDX se bloqueó hasta los 20 minutos de inyectada. Luego de los 25 minutos se observó una disminución de la PA del 15-30%*. El RX821002 no tuvo efectos per se sobre la PA, pero bloqueó la disminución de la PA producida por diferentes dosis de Agm. Por otra parte, la inyección ICV de Agm incrementó la actividad de NOS en bulbo raquídeo a los 10 y 45 minutos (25%* y 50%*, respectivamente). Los resultados obtenidos nos permiten concluir que en una primera fase la Agm mediaría sus efectos sobre la PA a través de los receptores imidazólicos y alfa-2D adrenérgicos, y en una segunda fase solo por los alfa-2D adrenérgicos. Además, el incremento en la actividad de la NOS en el bulbo raquídeo podría ser responsable, en parte, de los efectos de la Agm sobre la PA.

278. (7502) DIFERENTE REGULACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR DE RIANODINA (RYR2) Y DE FOSFOLAMBAN (PLN) DURANTE LA ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN (I/R) MIOCÁRDICA. SAID, MARÍA MATILDE; FERRERO, PAOLA; VITTONI, LETICIA; MUNDIÑA-WEILENMANN, CECILIA; MATTIAZZI, ALICIA

Centro de Investigaciones Cardiovasculares; Centro de Investigaciones Cardiovasculares - Facultad de Cs. Médicas - UNLP

El canal de Ca(2+) o receptor de rianodina, (RyR2) del retículo sarcoplasmático cardíaco (RS), es susceptible de fosforilación por la PKA y por la CaMKII en el sitio Ser-2809. Resultados previos de nuestro laboratorio, muestran que la fosforilación de PLN, otra proteína del RS, aumenta a diferentes tiempos durante la I/R, en los residuos Ser-16 (sitio de PKA) y Thr-17 (sitio de CaMKII), indicando un incremento de la actividad de ambas quinasas. En el corazón perfundido de rata, la fosforilación del sitio Ser-2809 de RyR2 disminuye significativamente a los 20min de I en 57,84±3,18% (n=3) y a 1 y 5min de R en 31,28±6,41% (n=3) y 25,41±6,53% (n=4) respectivamente, retornando a valores preisquémicos a los 15min de R. Esto ocurre a pesar de un aumento significativo de la fosforilación de PLN en Ser-16 a 20min de I (96,3±22,9%), y en Thr-17 a 1min de R (124,5±24,7%), medida simultáneamente. Una explicación para el diferente estado de fosforilación de PLN y RyR2, podría ser la diferente actividad de las fosfatasa inducida por la acidosis una condición presente durante la I/R temprana. Mientras que PLN es desfosforilada principalmente por PP1, RyR2 también está asociado a PP2A. La acidosis, disminuye la actividad de la PP1 en 65±5.51%, pero aumenta la actividad de PP2A en 18±8% cuando el pH cae de 7.0 a 6.0. Los resultados muestran que RyR2 se desfosforila durante la I/R, y se sugiere que un aumento de la actividad de PP2A, podría ser la causa. Esta menor fosforilación contribuiría al manejo alterado Ca(2+) durante la injuria por I/R.

279. (7516) DIFERENTE COMPORTAMIENTO DE LOS DEPÓSITOS INTRACELULARES SENSIBLES A CAFEÍNA Y NORADRENALINA EN AORTAS DE RATAS CONTROLADAS Y DIABÉTICAS POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ). RINALDI, GUSTAVO

Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

Objetivo: estudiar la liberación de Ca(2+) intracelular inducida por Noradrenalina 1 µM (NA) o Cafeína 10 mM (CA) en ratas diabéticas por STZ (60 mg/kg i.p., n= 11) y en sus controles (n= 9). Métodos: medición en anillos aórticos de fuerza pico (mg fuerza/mg de peso del anillo) con NA o CA luego de 3 minutos en Ca(2+) = 0 mM + EGTA 0.5 mM y cambiando las condiciones de los 60 minutos previos de incubación: (A) control (Ca(2+) = 1.6 mM y K(+) = 5 mM), (B) alto Ca(2+) (Ca(2+) = 3.0 mM y K(+) = 5 mM) y (C) alto K(+) (Ca(2+) = 1.6 mM y K(+) = 35, 70 ó 105 mM). En situaciones (A) y (B) los anillos están en reposo, en la (C) se contraen por apertura de canales voltaje-operados. Resultados: la incubación (A) produjo contracción deprimida en ratas diabéticas (C-NA = 12.0 ± 1.6, STZ-NA = 8.3 ± 0.6; C-CA =

2.1 ± 0.3, STZ-CA = 0.7 ± 0.2). La incubación (B) incrementó la posterior respuesta intracelular (C-NA = 16.2 ± 2.3, STZ-NA = 10.4 ± 0.8; C-CA = 3.1 ± 0.4, STZ-CA = 1.5 ± 0.3, P<0.05). La incubación (C) aumentó la posterior respuesta intracelular a NA solamente en ratas control: K-35(C) = 23.3 ± 2.5, K-70(C) = 31.7 ± 3.5, K-105(C) = 31.9 ± 3.2 (P< 0.05) pero no en ratas diabéticas: K-35(D) = 8.7 ± 0.7, K-70(D) = 9.1 ± 0.6, K-105(D) = 8.9 ± 0.9, (NS). La respuesta intracelular a CA no fue alterada en forma significativa por la incubación (C) ni en ratas controles ni en diabéticas. Conclusiones: 1) las ratas diabéticas acumulan menos Ca(2+) en sus depósitos sensibles a NA y CA, 2) dichos depósitos se rellenan en forma dependiente de la concentración extracelular de Ca(2+) en ambos tipos de ratas, 3) la presumible elevación del Ca(2+) intracelular de la incubación (C), evidenciada en la contracción producida durante la misma, no afectó a los depósitos sensibles a CA, y 4) el relleno de los depósitos sensibles a NA solamente fue afectado por la incubación (C) en ratas controles, demostrando una mayor dependencia del Ca(2+) extracelular en ratas diabéticas con dicha forma de estimulación.

280. (7811) EFECTOS DE LA ADENOSINA Y LA REPERFUSIÓN CON BAJO CALCIO SOBRE LA FASE DE HIPERCONTRACCIÓN POSTISQUÉMICA DEL MIOCARDIO ATONTADO EN CONEJOS. PALLEIRO, JIMENA; GONZÁLEZ, GERMÁN E.; DONATO, MARTÍN; RODRÍGUEZ, MANUEL; MORALES, CELINA; GELPI, RICARDO J

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Depto de Patología, Facultad de Medicina, UBA.

El objetivo fue determinar si la fase de hipercontracción postisquémica (HC) observada al comienzo de la reperfusión (R) en el miocardio atontado, presenta alteraciones diastólicas y si la R con bajo Ca++ o adenosina (ADO), modifica las mismas. Corazones aislados e isovolúmicos de conejos fueron divididos en 3 grupos (G). G1 (n=11) fue perfundido con solución de Ringer ([Ca++]=2mM), sujeto a 15 min de isquemia y 30 de R. El G2 (n=10) se reperfundió durante 10 min con Ringer ([Ca++]=1mM) el cual fue incrementado a 1.5 y 2 mM a los 10 y 20 min de R respectivamente, y G3 (n=12) fue perfundido con ADO (0.03µl/kg/min) desde 10 min antes de la isquemia y durante toda la R. Se evaluó la contractilidad miocárdica (+dP/dtmáx, mmHg/seg), la rigidez diastólica (presión diastólica final (PDFVI, mmHg)) y la relajación (T½ (mseg) y +P/-P). Los valores fueron expresados como X±ESM. Al minuto de R (tabla), la contractilidad se recuperó en G1 y G3 y se atenuó en G2. La PDFVI en G1 y G3 se correlacionó negativamente con el grado de HC (r=-0.63, p=0.04 en G1 y r=-0.71; p=0.01 en G3), o sea a mayor HC menor PDFVI. La R con bajo Ca++ atenuó el aumento de PDFVI. La relajación se enlenteció progresivamente hasta los 2 min en los 3 grupos (NS). *p<0.05vsG1; (%): corresponde al porcentaje del valor preisquémico.

	+dP/dt(%)	PDFVI	T½(%)	+P/-P(%)
G1	85.3±9.4	12.7±1.8	124.5±7.5	148.4±11.7
G2	50.8±4.9 ¹	7.7±0.7 ¹	127.6±7.0	137.6±12.8
G3	73.0±11.8	10.4±1.9	118.4±4.3	131.1±8.6

La perfusión con bajo Ca++ atenuó la HC y mejoró la rigidez mientras que la ADO no modificó la HC poniendo de manifiesto que el flujo coronario no es un factor determinante de la misma. La correlación entre PDFVI y HC se perdió en G2.

281. (7903) EL L-NAME REVIERTE LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PI) SOBRE LA FUNCIONALIDAD DEL CORAZÓN SOMETIDO A ISQUEMIA (I) - REPERFUSIÓN (RP) DE RATAS ALIMENTADAS(AL) O AYUNADAS(AJ). MARINA PRENDES, MARÍA GABRIELA; GARCÍA, JIMENA VANESA;

KIRCHHEIMER, CAROLINA ; SAVINO, ENRIQUE; VARELA, ALICIA

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

El ayuno, que activa el catabolismo lipídico, acelera la recuperación funcional en corazones de rata perfundidos Langendorff sometidos a I (25 min)-RP (30 min). El PI mejora la recuperación funcional tanto en AL como AY. El objetivo fue investigar si el óxido nítrico (ON) está implicado en los efectos beneficiosos agudos del PI. Se evaluó la acción del L-NAME (inhibidor de la óxido nítrico sintetasa) en corazones AL o AY 24 hs sometidos a PI (3 min I-5 min RP) previos a la I sostenida. El L-NAME 50µM fue agregado al medio 5 min antes del PI hasta el final de la I sostenida. En corazones controles el L-NAME fue agregado 13 min antes de la I sostenida. Los 30 min de RP se realizaron en ausencia de L-NAME. La contractilidad se evaluó mediante el producto Presión Sistólica x Frecuencia (Px F) y la contractura con la Presión Diastólica Final (PDF). La estadística se hizo con ANOVA de tres factores con medidas repetidas (n=8). El L-NAME no afectó los parámetros contráctiles basales en ninguna de las condiciones metabólicas. El ayuno mejoró la recuperación funcional (Px F: 75±10 vs 23±8% a los 15 min de RP, p<0,01, PDF: 8±3 vs 35±10 a los 5 min de RP, p<0,05). El L-NAME no afectó la contractilidad post-ischémica en AL, pero disminuyó la recuperación en AY (Px F: 41±8% a los 15 min, p<0,01). El PI mejoró la recuperación en AL y AY (Px F: 91±9% en AL, 106±11% en AY, a los 15 min de RP, p<0,05, PDF: 2±0,8% en AL a los 5 min RP, p<0,01), efecto que fue abolido por el L-NAME (Px F: AL 41±5, AY 45±7% a los 15 min de RP, p<0,01, PDF: 17±5% a los 5 min RP, p<0,05). Se concluye que el ON participaría en los efectos beneficiosos agudos del PI. La inhibición de la síntesis de ON es nociva para el corazón isquémico cuando el metabolismo está desviado hacia el catabolismo lipídico, como ocurre en el ayuno.

282. (7919) EL L-NAME REVIERTE PARCIALMENTE LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DEL DIAZÓXIDO (DZ) SOBRE LA FUNCIONALIDAD DEL CORAZÓN SOMETIDO A ISQUEMIA (I) - REPERFUSIÓN (RP) DE RATAS ALIMENTADAS(AL) O AYUNADAS 24 HS(A Y). MARINA PRENDES, MARÍA GABRIELA; GARCÍA, JIMENA ; TESTONI, GUSTAVO; SAVINO, ENRIQUE; VARELA, ALICIA

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

El DZ, abridor de los canales mitocondriales de K sensibles al ATP (K-ATP), mejora la recuperación funcional post-ischémica en corazones AL y AY. Existen evidencias que sugieren que el óxido nítrico (ON) sería capaz de activar directamente los K-ATP y potenciar los efectos del DZ. Sobre esta base se evaluó la acción del L-NAME 50µM (inhibidor de la ON sintetasa) en corazones AY o AL perfundidos Langendorff, sometidos a I (25 min)-RP (30 min), tratados con DZ 10 µM. El DZ fue agregado al medio de perfusión 10 min antes de la I sostenida y el L-NAME 5 min antes del DZ hasta el final de la I. La contractilidad se evaluó mediante el producto Presión Sistólica x Frecuencia (Px F) y las velocidades de contracción y relajación (±dP/dt) y la contractura con la Presión Diastólica Final (PDF). La estadística se hizo con ANOVA de tres factores con medidas repetidas (n=8). El L-NAME, agregado al medio de perfusión 15 min antes de la I sostenida no afectó los parámetros contráctiles basales en ninguna de las condiciones metabólicas pero disminuyó la recuperación postischémica en AY (Px F: 41±8 vs 69±11% a los 15 min de RP, p<0,01). El DZ mejoró la recuperación especialmente en AL (Px F: 71±8 vs 47±9% en AL, p<0,01 y 83±9 vs 69±11, n.s. en AY, +dP/dt: 67±9 vs 44±7 p<0,01 en AL 82±9 vs 73±11, n.s. en AY, a los 15 min de RP, PDF: 13±5 vs 49±11% p<0,01 en AL, a los 5 min de RP), efecto que fue abolido por el L-NAME (Px F: 31±7, p<0,01 a los 15 min de RP, PDF: 22±3% a los 5 min de RP, en AL). Los resultados sugieren la participación del ON en los efectos beneficiosos que resultan de la apertura de los canales K-ATP. También indican una mayor sensibilidad a la inhibición isquémica de

la ON sintetasa en el estado de ayuno, estado en el cual el catabolismo lipídico está acelerado.

283. (7929) LA OXFENICINA REVIERTE LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DEL AYUNO SOBRE EL CORAZÓN DE RATA SOMETIDO A ISQUEMIA GLOBAL (I) - REPERFUSIÓN (RP). GARCÍA, JIMENA; MARINA PRENDES, MARÍA GABRIELA; GIMÉNEZ, CINTIA; GONZÁLEZ, MARCELA; SAVINO, ENRIQUE; VARELA, ALICIA

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

El ayuno previo, que activa el catabolismo lipídico, acelera la recuperación funcional en corazones de rata perfundidos Langendorff sometidos a I-RP. Este efecto se acompaña de una mayor acumulación isquémica de ésteres acil-CoA de cadena larga (LCCoA), catabolitos intermedios de los ácidos grasos. El objetivo fue evaluar la posible participación de los LCCoA en los efectos beneficiosos del ayuno. Para ello se investigaron los efectos de la oxfenicina (OX) que disminuye la acumulación de LCCoA mediante la inhibición de la carnitina-palmitoil transferasa 1, en corazones provenientes de ratas alimentadas (AL) o ayunadas 24 h (AY) sometidos a I (25 min)-RP (30 min). La OX 2 mM fue agregada al medio de perfusión 10 min antes de la I. La contractilidad se evaluó mediante el producto Presión Sistólica x Frecuencia (Px F) y las velocidades de contracción y relajación (±dP/dt). La contractura, mediante la Presión Diastólica Final (PDF). En un grupo paralelo de corazones se midió el contenido tisular de lactato al final de la I. La estadística se hizo con ANOVA (n=8). El ayuno mejoró la recuperación funcional (Px F: 88 ± 6 vs 59 ± 9% a los 30 min de RP, p<0,05, +dP/dt: 76 ± 10 vs 43 ± 9%, -dP/dt 82 ± 10 vs 48 ± 8% a los 15 min de RP, p<0,05). La OX no afectó la contractilidad en AL, pero disminuyó la recuperación en AY (Px F: 61 ± 11% a los 30 min de RP, p<0,05), sin modificar las ±dP/dt ni la PDF. El lactato al final de la I fue menor en AY (112 ± 15 vs 153 ± 14 µmol/gseco, p<0,05, indicando una disminución de la glucólisis anaeróbica como consecuencia del activado catabolismo lipídico, efecto que fue revertido por la OX (167 ± 16, p<0,05) Los resultados indican que los efectos beneficiosos del ayuno desaparecen al inhibir la oxidación de ácidos grasos, sugiriendo una participación de los LCCoA en la anaplerosis del ciclo de Krebs durante la reperfusión.

284. (7936) EFECTOS DE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN SOBRE CORAZONES PERFUNDIDOS DE RATAS DIABÉTICAS POR ESTREPTOZOTOCINA. TESTONI, GUSTAVO (1); ASTUDILLA, CHRISTIAN (1); VÁZQUEZ, NANCY (1); DONATO, MARTÍN (2); D'ANNUNZIO, VERÓNICA (2); GELPI, RICARDO (2); MARINA PRENDES, MARÍA GABRIELA (1); VARELA, ALICIA (1); SAVINO, ENRIQUE

Cát. de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA IQUIMEFA-CONICET (1) Depto. de Patología, Facultad de Medicina, UBA (2).

En estudios previos demostramos que los corazones de ratas diabéticas desarrollan menos contractura en isquemia y recuperan mejor la función contráctil al reperfundir y que este comportamiento no se relaciona con cambios en la glucólisis. En este trabajo buscamos correlaciones con el aporte energético de los sustratos de reserva y con el daño tisular. Ratas Wistar de 200-250 g se trataron con estreptozotocina 50 mg/Kg i.v. y los controles con vehículo. 3 semanas después los corazones fueron perfundidos según Langendorff con Krebs bicarbonato, glucosa 10 mM, estimulados a 5 Hz. Luego de 30 min de estabilización se aplicó 35 min de isquemia global interrumpiendo la perfusión y después 30 min de reperfusión. Se registraron la presión desarrollada, la presión diastólica final y las +/-dP/dt máximas. Con métodos enzimáticos se midieron el glucógeno y el triacilglicerol y con el método del feniltetrazolio el tejido no viable. La estadística se hizo con ANOVA. Se midió que el tejido no viable (% del área en riesgo) fue de 15,7±7,0 los controles y 14,4±4,3 las

diabéticas. Los contenidos de glucógeno (mg/100 mg ps) para controles y diabéticas respectivamente fueron: preischemia 340 ± 74 y 322 ± 66 ; posischemia 97 ± 57 y 123 ± 57 ; fin de la reperfusión 350 ± 108 y 53 ± 13 ($p < 0,05$). El triacilglicerol ($\mu\text{mol/g ps}$) de controles y diabéticas respectivamente fue: preischemia $5,1 \pm 0,2$ y $4,4 \pm 0,3$; posischemia $4,9 \pm 0,5$ y $4,4 \pm 0,6$; fin de la reperfusión $5,6 \pm 0,3$ y $4,4 \pm 0,6$. Los resultados sugieren que si bien los controles resintetizaron glucógeno no hubo cambios en los sustratos energéticos que expliquen el mejor funcionamiento del grupo diabético sometido a isquemia-reperfusión. La ausencia de cambios de la fracción de tejido no viable indica que los efectos protectores se ejercen sobre los cardiomiocitos viables.

CARDIOVASCULAR, RESPIRATORIO Y RENAL 4

285. (6607) EFECTOS DEL AGONISTA GABA B BACLOFEN SOBRE LA ACTIVIDAD Y ABUNDANCIA DE LA Na^+ , K^+ ATPASA RENAL. DONATO, VERÓNICA; TRUMPER, LAURA; MONASTEROLO, LILIANA

Farmacología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. CONICET. CIUNR. Fundación Maciel Parque.

En trabajos previos observamos que la administración aguda in vivo de baclofen (BAC) provoca un aumento de diuresis, natriuresis y clearance osmolar asociado a una disminución en la capacidad de concentrar la orina y en la abundancia de acuaporina 2 en membrana plasmática. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las acciones de baclofen sobre la Na^+ , K^+ ATPasa renal. Las ratas fueron inyectadas con BAC 1 mg/Kg s.c. o con su vehículo (C). Luego de 16 horas se extrajeron los riñones y se separó médula de corteza para la obtención de los correspondientes homogenados. La actividad de Na^+ , K^+ ATPasa ($\mu\text{mol Pi/h.mg prot.}$) se determinó por el método de Summer y la abundancia (unidades arbitrarias) de esta proteína se evaluó utilizando técnicas de Western blot. BAC provocó una disminución de la actividad de Na^+ , K^+ ATPasa en médula renal ($C = 13,93 \pm 1,92$; $\text{BAC} = 4,86 \pm 1,19$, $n = 7$, $p < 0,01$) y una tendencia a disminuir la actividad de esta enzima en corteza que no alcanzó significado estadístico ($C = 3,76 \pm 1,38$; $\text{BAC} = 1,42 \pm 0,37$, $n = 4$). También se observó un decremento en la abundancia de Na^+ , K^+ ATPasa en médula ($C = 4,34 \pm 0,51$, $n = 4$; $\text{BAC} = 1,53 \pm 0,08$, $n = 3$, $p < 0,01$), sin cambios en corteza renal ($C = 4,14 \pm 0,30$, $n = 3$; $\text{BAC} = 5,97 \pm 1,99$, $n = 4$) (Gel-Pro Analyzer). Las acciones del agonista GABA_B sobre la Na^+ , K^+ ATPasa contribuirían a los efectos previamente descritos sobre parámetros tubulares. Estos resultados suman evidencias de la posible participación del sistema GABA en la modulación de la función renal.

286. (7108) LA ANANDAMIDA REDUCE LAS RESPUESTAS CRONOTRÓPICAS A LA NORADRENALINA EN AURÍCULAS DE RATA. SIFONIOS, LAURA; ORLIAC, MARÍA LUZ; PERONI, ROXANA; CELUCH, STELLA MARIS; ADLER-GRASCHINSKY, EDDA

Instituto de Investigaciones Farmacológicas (CONICET)-Junín 956, 5º piso, Buenos Aires, Argentina

Se ha demostrado que la bradicardia inducida por la administración endovenosa de cannabinoides es consecuencia de la disminución del tono simpático debido a una inhibición presináptica de la liberación de noradrenalina (NA). Sin embargo, no se ha investigado si estas sustancias modifican, además, las respuestas cronotrópicas al neurotransmisor simpático. En consecuencia, en este trabajo se investigó si el endocanabinoide anandamida (AEA) produce cambios en las respuestas cronotrópicas positivas inducidas por NA en aurículas aisladas de ratas macho Sprague-Dawley. La AEA ($10 \mu\text{M}$) desplazó hacia la derecha en alrededor de una unidad log las curvas de dosis-respuesta a NA. Este efecto no fue modificado por un antagonista de receptores cannabinoides CB₂ (AM 630; $5 \mu\text{M}$) pero fue prevenido tanto por un antagonista de receptores cannabinoides CB₁ (SR 141716A; $1 \mu\text{M}$) como por un antagonista de receptores

vaniloideos VR1 (capsazepina; $1 \mu\text{M}$). Sin embargo, ni un agonista específico de receptores cannabinoides (WIN55,212-2; $1 \mu\text{M}$), ni un agonista específico de receptores VR1 (capsaicina, $10 \mu\text{M}$), ni la combinación de ambos, modificaron las respuestas cronotrópicas a NA. Por otra parte, el desplazamiento causado por AEA en las curvas de dosis-respuesta a NA fue prevenido completamente por un inhibidor de la óxido nítrico (NO) sintasa (L-NAME, $300 \mu\text{M}$) como así también por un inhibidor de la guanilato ciclasa (ODQ, $1 \mu\text{M}$). Se concluye que AEA inhibiría las respuestas cronotrópicas positivas a NA a través de un mecanismo en el que participa la cascada NO/GMP cíclico. La observación que el efecto de AEA haya sido bloqueado tanto con un antagonista de receptores CB₁ como con un antagonista de receptores VR1 pero que dicho efecto no se haya podido reproducir con agonistas específicos para esos receptores, sugiere que el sitio de acción de AEA para inhibir las respuestas a NA podría ser diferente de los receptores cannabinoides y vaniloideos clásicos ya caracterizados.

287. (7112) PARTICIPACIÓN DE LA PROTEIN KINASA C EN LA MODULACIÓN DE LOS EFECTOS RELAJANTES DEL ENDOCANABINOIDE ANANDAMIDA. ORLIAC, MARIA LUZ; PERONI, R; CELUCH, SM; ADLER-GRASCHINSKY, E

Instituto de Investigaciones Farmacológicas

El endocanabinoide anandamida (AEA) relaja la vasculatura mesentérica a través de la activación del canal vaniloide VR1 localizado en terminales sensoriales perivasculares, cuya actividad es modulada positivamente por la protein kinasa C (PKC). Se ha descrito que la PKC es activada por lipopolisacáridos (LPS) bacterianos en modelos de endotoxemia experimental en los que, además, se encuentran potenciados los efectos vasodilatadores de la anandamida (Orliac et al., JPET 2003, 304:179). El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la activación de la PKC es capaz de mimetizar la potenciación de los efectos vasodilatadores de la AEA observada en condiciones de endotoxemia. Las respuestas vasodilatadoras a drogas fueron evaluadas como porcentaje de la reducción de una contracción inicial a bolos de noradrenalina (NA) en lechos mesentéricos control o aislados 6 horas después de la administración i.p. de 5 mg/kg de LPS. La perfusión del activador de la PKC, acetato de forbol miristato (PMA, 10^{-7} M) no modificó las respuestas a NA en condiciones control, pero redujo significativamente las contracciones a NA ($p < 0,001$) en lechos mesentéricos aislados de ratas endotoxémicas. Este efecto fue prevenido por deservación in vitro de los terminales sensoriales mediante 2 horas de perfusión con el agonista del receptor VR1, $10 \mu\text{M}$ capsaicina (CPI). Este tratamiento, también fue capaz de evitar la vasodilatación inducida por AEA y CPI tanto en lechos mesentéricos control como endotoxémicos. Por otra parte, en lechos mesentéricos control, la perfusión previa y simultánea de 10^{-7} M PMA pero no de su análogo inactivo, 10^{-7} M 4 alfa -forbol, potenció los efectos vasodilatadores de AEA ($p < 0,001$) y de CPI ($p < 0,001$). Se concluye que 1) la activación de la PKC potenciaría los efectos vasodilatadores de AEA mediados por la activación del receptor VR1, 2) los ésteres de forbol podrían tener un efecto agonista sobre el receptor VR1 sensibilizado durante la endotoxemia.

288. (7208) MODELOS CINÉTICOS-DINÁMICOS (PK-PD) DEL METOPROLOL EN RATAS COARTADAS. HÖCHT, CHRISTIAN; DIVERNIERO, CARLA; OPEZZO, JAVIER AW; TAIRA, CARLOS A

Cátedra de Farmacología, FFyB, UBA. Junín 956, Cap Federal.

El propósito del presente trabajo fue estudiar la relación entre los niveles plasmáticos de metoprolol y sus efectos cardiovasculares en ratas con coartación aórtica (CoA) en un estadio temprano y crónico de hipertensión arterial y ratas con operación simulada (OS) mediante el uso de la técnica de microdialísis. Se evaluó la relación entre las concentraciones plasmáticas de metoprolol y el cambio de presión arterial media

(PAM) y frecuencia cardíaca (FC) mediante el uso de modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos (PK-PD). No se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de metoprolol entre ratas CoA y OS. En todos los grupos experimentales se encontró una asociación entre las concentraciones de metoprolol y sus efectos cronotrópicos e hipotensores. Las ratas CoA en estadio temprano de hipertensión demostraron una mayor sensibilidad al efecto cronotrópico, así como un mayor efecto máximo (Emax: $-38 \pm 2\%$, $n=5$, $p < 0,05$) que los animales OS (Emax: $-27 \pm 1\%$, $n=5$). El efecto antihipertensivo del metoprolol no fue distinto entre los animales OS y CoA en un estadio temprano de hipertensión. En las ratas CoA crónicas, no se observaron diferencias en el efecto cronotrópico del fármaco con respecto a animales normotensos. El efecto antihipertensivo del metoprolol fue significativamente mayor en ratas CoA crónicas (Emax: -26 ± 4 mmHg, $n=5$, $p < 0,05$) que en los correspondientes animales normotensos (Emax: -14 ± 2 mmHg, $n=5$, $p < 0,05$). Los animales hipertensos además presentaron una mayor sensibilidad al efecto hipotensor. Por lo tanto, en el estadio temprano de CoA, el incremento del efecto cronotrópico de metoprolol podría explicar la existencia de una sobreactividad simpática cardíaca, la cual se normalizaría en la etapa crónica de hipertensión. El mayor efecto hipotensor del metoprolol indicaría un compromiso del receptor β_1 -adrenérgico en el mantenimiento del estado hipertensivo crónico por CoA.

289. (7209) EFECTO ANTIHIPERTENSIVO HIPOTALÁMICO DEL IRBESARTAN EN RATAS CON COARTACION AORTICA CRONICA. HÖCHT, CHRISTIAN; OPEZZO, JAVIER AW; TAIRA, CARLOS A

Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

El objetivo del trabajo fue estudiar la cinética central y plasmática del irbesartán (IRB) y su posible efecto antihipertensivo hipotalámico en ratas con operación simulada (OS) y ratas con coartación aórtica (CoA) crónica utilizando la técnica de microdiálisis. Se utilizaron ratas Wistar anestesiadas 42 días después de la CoA o OS. Para el estudio de la cinética plasmática se insertó una sonda de microdiálisis tipo «shunt» en la arteria carótida. En otro experimento, se estudiaron los niveles hipotalámicos de IRB y sus efectos cardiovasculares. De acuerdo a los niveles hipotalámicos de IRB alcanzados, el hipotálamo anterior fue perfundido con solución Ringer conteniendo IRB (aproximadamente $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) midiéndose los efectos cardiovasculares durante el período de perfusión. El IRB ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) i.v. indujo un descenso tardío de la frecuencia cardíaca (FC) en ratas CoA (DFC: -42 ± 10 lpm, $n=5$, $p < 0,05$) pero no en ratas OS (DFC: 11 ± 13 lpm, $n=5$). La administración i.v. de IRB redujo la presión arterial media (PAM) en ambos grupos experimentales, pero el efecto hipotensor fue mayor en las ratas CoA (DPAM: $-39,9 \pm 5,0$ mmHg, $n=5$, $p < 0,05$) que en ratas OS (DPAM: $-25,4 \pm 2,1$ mmHg, $n=5$). Los niveles plasmáticos de IRB no fueron diferentes entre ambos grupos experimentales. La distribución del IRB en el hipotálamo anterior fue significativamente mayor en animales CoA. La perfusión hipotalámica de IRB indujo un efecto antihipertensivo en ratas hipertensas por CoA (DPAM: $-15,1 \pm 1,0$ mmHg, $n=5$, $p < 0,05$) pero no en animales OS. En conclusión, la CoA crónica no modificó el perfil plasmático del IRB, pero sí incremento la distribución central del mismo. El mayor efecto hipotensor del IRB observado en ratas CoA sugiere el compromiso del receptor AT1 en el mantenimiento del estado hipertensivo crónico en este modelo. El efecto hipotensor sistémico del IRB en animales CoA podrían ser explicado, al menos en la parte, debido a una acción sobre el sistema angiotensinérgico hipotalámico.

290. (7226) GABA Y CGRP: POSIBLES MEDIADORES DE LA RESPUESTA HIPOTENSORA INDUCIDA POR ANANDAMIDA A NIVEL ESPINAL. GARCÍA, MARÍA DEL CARMEN; ADLER-GRASCHINSKY, E.; CELUCH, SM

Instituto de Investigaciones Farmacológicas

Previamente observamos que el endocanabinoide anandamida (AEA), administrado a nivel espinal en ratas anestesiadas, produce una disminución de la presión arterial a través de la activación tanto de receptores canabinoides CB1 como vaniloides VR1. En este estudio, se analizó la participación de neurotransmisores/neuromoduladores de la actividad preganglionar simpática, ácido gama-aminobutírico (GABA), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y óxido nítrico (NO), en la hipotensión inducida por AEA. Se usaron ratas Sprague-Dawley (250-280 g) anestesiadas con uretano $1,2 \text{ mg/kg}$ (i.p.). Se colocó un catéter en la arteria femoral para el registro de la presión arterial (PA), y otro a nivel T10-L1 de la médula espinal para la administración intratecal de drogas. La disminución máxima en la PA media (delta PAM) inducida por AEA (100 nmol) fue de $-18,6 \pm 1,2$ mmHg ($n=7$). El efecto hipotensor de la AEA fue antagonizado tanto por el bloqueante GABA-A selectivo, bicuculina ($8,8 \text{ nmol}$; delta PAM: $-8,1 \pm 1,9$ mmHg, $n=6$), como por el bloqueante GABA-B selectivo, 2-hidroxi saclofen (110 nmol ; delta PAM: $-5,0 \pm 1,2$ mmHg, $n=5$). El antagonista de receptores a CGRP, CGRP8-37, en una dosis (5 nmol) que abolió la hipotensión causada por CGRP, redujo significativamente la hipotensión inducida por AEA (delta PAM: $-10,6 \pm 1,2$ mmHg, $n=6$). Una dosis mayor de CGRP8-37 (10 nmol) no produjo una mayor reducción en la respuesta hipotensora a AEA (delta PAM: $-8,8 \pm 1,4$ mmHg, $n=4$). El inhibidor de la NO sintasa (NOS), L-NAME ($1 \mu\text{mol}$), no modificó la respuesta a AEA (delta PAM: $-19,7 \pm 2,1$ mmHg, $n=5$) aunque esta dosis inhibió totalmente la actividad de la NOS espinal, determinada por la técnica de Bredt y Snyder (PNAS 87: 682, 1990): grupo control, $6,34 \pm 0,81$ pmol/mg; grupo L-NAME, $0,23 \pm 0,097$ pmol/mg ($n=5$). Se sugiere que la respuesta hipotensora inducida por AEA estaría mediada tanto por GABA, a través de la activación de receptores GABA-A y GABA-B espinales, como por el CGRP, mientras que el NO no participaría en dicho efecto.

291. (7236) NORADRENALINA Y ANGIOTENSINA II ESTIMULAN LA LIBERACION DE PROSTANOIDES VASOCONSTRICTORES EN EL LECHO MESENTÉRICO. PUYÓ, ANA; MAYER, MARCOS; DONOSO, ADRIANA; FAVIER, ANABEL; PEREDO, HORACIO

Cátedra de Anatomía Macro y Microscópica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Facultad de Medicina; Colegio Nacional de Buenos Aires, UBA y CONICET.

Los prostanoideos (PR), productos de ciclooxigenación del ácido araquidónico ejercen efectos vasoactivos y son producidos por la pared vascular. En trabajos anteriores se estudió la influencia de agentes vasodilatadores y vasoconstrictores sobre la producción de PR en el lecho mesentérico (LM) perfundido. El objetivo del presente trabajo fue analizar los efectos de la incubación con noradrenalina (NA) y angiotensina II (All) sobre la liberación de PR en LM de ratas Sprague-Dawley. Los PR liberados al medio de incubación por los LM se analizaron por HPLC en fase reversa con detección UV, previa extracción. Cada LM fue dividido en 2 partes iguales; una fue incubada en solución de Krebs y se utilizó para estudiar la liberación espontánea (LE) de PR ($n=5$); y la otra fue incubada en presencia de NA $1 \mu\text{M}$ ($n=5$) o de All $0,1 \mu\text{M}$ ($n=5$). La liberación de prostaglandina (PG) 6 ceto F1 alfa (metabolito estable de prostaciclina) y la de PGE2 no fueron afectadas por NA ni por All. NA estimuló la liberación de tromboxano (Tx) B2 (metabolito estable de TxA2): LE (ng de PG/mg de tejido) $54,8 \pm 6,5$ vs. NA $111,2 \pm 11,8$, $p < 0,005$; y la de PG F2 alfa, LE: $93,8 \pm 10,5$ vs. NA $174,1 \pm 15,5$, $p < 0,005$. La All estimuló la liberación de TxB2: LE $49,3 \pm 4,7$ vs. All $116,4 \pm 11,8$, $p < 0,05$, mientras que, a diferencia de lo observado con NA, no modificó significativamente los niveles de PG F2 alfa. Considerando que los PR cuya liberación fue estimulada por NA y All tienen efectos vasoconstrictores, los mismos podrían intervenir en las acciones de NA y All sobre la vasculatura de resistencia. Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que los efectos de NA tendrían una mayor dependencia con los PR que los de All.

292. (7483) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD TROMBOLÍTICA Y PROFIBRINOLÍTICA DEL DERMATÁN SULFATO. ATTORRESI, AI; ALBERTO, MF; KELLER-HESS, L; PALASSI-GERÉZ, P; LAZZARI, M; RECONDO, E; CALABRESE, GC

Cát. Biología Celular. F. Farm. y Bioquímica UBA; F. de Ciencias Exactas y Naturales. UBA-Academia Nacional de Medicina.

El dermatán sulfato (DS) es un heteropolisacárido complejo que cataliza la inhibición de Trombina causada por el Cofactor II de la Heparina. El objetivo del presente trabajo es el estudio de las propiedades estructurales, la actividad trombolítica y profibrinolítica del DS de bajo peso molecular (LMMDS), obtenido por depolimerización química. La caracterización estructural incluyó: la determinación del peso molecular por electroforesis, la ubicación de los sulfatos por RMN de ^{13}C y la cuantificación del grado de sulfatación. El estudio de biodisponibilidad fue realizado por medición del tiempo de trombina (TT) y el efecto sobre la actividad fibrinolítica (AF) dependiente del activador tisular del plasminógeno (tPA) por la técnica de lisis de la fracción de euglobulinas en placas de fibrina. El LMMDS se administró por vía endovenosa (0.2 mg/kg de peso) a ratas Wistar (250 g). El efecto in vitro sobre la AF del plasma normal, fue determinado en placas de fibrina preparadas en presencia de concentraciones crecientes de LMMDS. La actividad trombolítica fue estudiada en un modelo de trombosis venosa inducida en ratas. El estudio estructural mostró una población de LMMDS de 5 KDa, altamente sulfatado (27.50±0.77 ug%), en las posiciones C2 del idurónico y carbonos C4-6 de la galactosamina. La prolongación del TT fue máxima a los 30 min luego de la administración [basal: 36.23±1.28 seg; 30 min: 76.82±4.59 seg ($P<0.001$)]; al igual que la AF [basal: 10.98±0.17 mm, 30 min: 14.13±0.75 mm ($P<0.001$)]. El efecto in vitro de LMMDS no registró diferencias. El peso del trombo de los animales tratados con LMMDS presentó una disminución significativa comparado con los obtenidos en los animales tratados con DS de alto peso molecular y los controles (LMMDS: 1.38±0.52mg, DS 2.67±0.57mg y control: 4.42±1.40mg). El LMMDS, altamente sulfatado en posiciones estratégicas, inhibiría más efectivamente a la trombina unida al coágulo y posiblemente provocaría un aumento de la AF dependiente de la liberación de tPA.

293. (7507) PRODUCCIÓN DE ESPECIES ACTIVAS DEL OXÍGENO (EAO) EN HIPERTENSIÓN (HTA): EFECTO DE LOSARTAN Y ATENOLOL EN AORTA Y CARÓTIDA. CAVANAGH, ELENA; FRAGA, CESAR; INÉS, STELLA; TOBLLI, JORGE; LEÓN, FERDER; FELIPE, INSERRA

Fisicoquímica, Fac. Farm. y Bioq., UBA Inínca, Fac. Medicina, UBA; Lab. Med. Experimental, Hosp. Alemán; Ponce School Medicine; Puerto Rico

El bloqueo del sistema renina angiotensina (SRA) reduce la producción vascular de EAO y mejora la función endotelial en HTA. Objetivo: Comparar el efecto del bloqueo del SRA con losartan con el de un β -bloqueante (atenolol) sobre la generación de EAO y la estructura vascular en ratas SHR con alta ingesta de sal. 40 ratas SHR de 12 semanas recibieron (5 meses) agua con: a) ningún agregado (SHR); b) 1.5% NaCl (SHR+S); c) 1.5%NaCl+Losartan (30 mg/kg.día) (SHR+S+L), y d) 1.5%NaCl+Atenolol (50 mg/kg.día) (SHR+S+A). 10 ratas WKY fueron controles. En SHR+S+L y SHR+S+A, la presión sistólica fue mayor que en WKY, y menor que en SHR y SHR+S. En SHR+S+L y WKY, el CICr fue más alto, y la proteína urinaria más baja que en SHR, SHR+S, y SHR+S+A. Losartan, pero no atenolol, previno cambios estructurales vasculares. Similares resultados se obtuvieron en carótidas. * vs WKY, SHR+S, SHR+S+L, SHR+S+A; # vs WKY, SHR, SHR+S+L, SHR+S+A; ** vs SHR+S+A; ## vs WKY; *** vs WKY, SHR+S+L, SHR+S+A; #### vs WKY, SHR, SHR+S+L. $p<0.05$.

Grupo	SupOx / Anillo pmol O ₂ -/s.mg peso seco	SupOx / homogen nmol/mg prot	MDA / homogen nmol Eq MDA/mg prot	eNOS / homogen nmol Citru/min. mg prot	SOD / homogen U/mg prot
WKY	10.6±1.0	0.6±0.1	15.1±1.3	4.3±0.4	15.7±4.7
SHR	14.1±0.9*	1.6±0.3##	49.1±7.3*	3.2±0.5	14.6±1.4
SHR+S	17.9±1.8#	2.4±0.6***	25.6±2.0####	4.6±0.7	9.1±2.3
SHR+S+L	9.6±0.6**	1.2±0.1	9.2±0.8**	4.0±0.6	14.4±0.2
SHR+S+A	5.7±0.4	1.1±0.7	35.2±3.8###	4.7±0.4	6.1±0.1####

Losartan previene más efectivamente que Atenolol, las alteraciones en la producción vascular de oxidantes en hipertensión con alta ingesta de sal. Este efecto sería independiente de la presión, y estaría involucrado en la protección vascular que provee el bloqueo del SRA.

294. (7561) PRODUCCIÓN DE ESPECIES ACTIVAS DEL OXÍGENO (EAO) EN HIPERTENSIÓN (HTA): EFECTO DE LOSARTAN Y ATENOLOL EN ARTERIA RENAL. CAVANAGH, ELENA; FRAGA, CESAR G; STELLA, INÉS; TOBLLI, JORGE; FERDER, LEÓN; INSERRA, FELIPE

Fisicoquímica, Fac. Farm. y Bioq., UBA; Inínca, Fac. Medicina, UBA; Lab. Med. Experimental, Hosp. Alemán; Ponce School Medicine, Puerto Rico

El bloqueo del sistema renina angiotensina (SRA) reduce la producción vascular de EAO y mejora la función endotelial en HTA. Objetivo: Comparar el efecto del bloqueo del SRA con losartan con el de un β -bloqueante (atenolol) sobre la generación de EAO y la estructura vascular en ratas SHR con alta ingesta de sal. 40 ratas SHR de 12 semanas recibieron (5 meses) agua con: a) ningún agregado (SHR); b) 1.5% NaCl (SHR+S); c) 1.5%NaCl+Losartan (30 mg/kg.día) (SHR+S+L), y d) 1.5%NaCl+Atenolol (50 mg/kg.día) (SHR+S+A). 10 ratas WKY fueron controles. En SHR+S+L y SHR+S+A, la presión sistólica fue mayor que en WKY, y menor que en SHR y SHR+S. En SHR+S+L y WKY, el CICr fue más alto, y la proteína urinaria más baja que en SHR, SHR+S, y SHR+S+A. Losartan, pero no atenolol, previno cambios estructurales en arteria renal. * vs WKY, SHR, SHR+S, SHR+S+A; # vs WKY, SHR, SHR+S+L, SHR+S+A; ** vs SHR+S+A; ## vs SHR+S+L; *** vs WKY, SHR+S+L, SHR+S+A; #### vs SHR, SHR+S+L; **** vs WKY, SHR, SHR+S+L; ##### vs WKY, SHR. $p<0.05$.

Grupo	SupOx / Anillo pmol O ₂ -/s.mg peso seco	SupOx / homogen nmol/mg prot	MDA / homogen nmol Eq MDA/mg prot	eNOS / homogen nmol Citru/min. mg prot	SOD / homogen U/mg prot
WKY	14.1±2.1	0.6±0.1	47.1±7.3	1.3±0.4	9.2±0.2
SHR	15.3±2.4	0.6±0.1##	214±67***	1.1±0.2	10.6±0.6**
SHR+S	45.2±16#	2.2±0.5#####	267±11***	0.9±0.3	6.9±0.3###
SHR+S+L	16.1±2.9	2.2±0.5	61.9±9	1.2±0.1	18.6±1.8*
SHR+S+A	9.8±1.2	0.9±0.2##	35.5±6.2	0.8±0.2	3.6±0.8****

Losartan previene, más efectivamente que Atenolol, alteraciones en la producción vascular renal de oxidantes en hipertensión con alta ingesta de sal. Este efecto sería independiente de la presión, y estaría involucrado en la protección vascular que provee el bloqueo del SRA.

**COMUNICACIÓN INTERCELULAR 2:
BIOMEMBRANAS 1**

295. (7184) EFECTO DE MELATONINA SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO DE LÍPIDOS Y PROTEÍNAS DE MEMBRANAS DE LOS SEGMENTOS EXTERNOS DE LOS FOTORRECEPTORES. GUAJARDO, MARGARITA; TERRASA, ANA; FERNANDEZ, JULIAN; CATALÁ, ÁNGEL

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

Las membranas de los segmentos externos de los fotorreceptores (ROS) son estructuras lipoproteicas en las que la rodopsina, se halla rodeada por fosfolípidos enriquecidos en ácidos grasos polinsaturados principalmente docosahexaenoico (22:6n3). Este entorno fluido, que permite los cambios conformacionales de la rodopsina durante el proceso visual, hace a estas membranas susceptibles al ataque por radicales libres. La alteración de las membranas afecta la fisiología normal de la retina y conduce a diversas patologías retinales. La melatonina (MT), sintetizada en la glándula pineal, retina y otros tejidos es capaz de reducir el estrés oxidativo secuestrando radicales libres y estimulando las enzimas antioxidantes. El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto de MT sobre la lipoperoxidación inducida por Fe(+2)-ascorbato de membranas ROS de retina bovina. El proceso se monitoreó por quimioluminiscencia (QL) midiéndose cpm cada 10 minutos durante diferentes tiempos de incubación (30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos) en membranas tratadas y no tratadas con MT. El daño oxidativo producido sobre los lípidos se analizó por cromatografía gaseosa y las alteraciones de las proteínas de membrana por SDS-PAGE. La incubación con MT produjo una inhibición de la QL de $33.70 \pm 1.31\%$ a los 180 minutos. El contenido de 22:6n3 disminuyó a medida que aumentó el tiempo de incubación con el sistema prooxidante desde $35.50 \pm 2.90\%$ hasta $12.65 \pm 1.86\%$ a los 180 minutos en las membranas no tratadas y solo hasta 25.05 ± 3.53 en las tratadas con MT. Los perfiles electroforéticos mostraron una disminución en el contenido de todas las proteínas, principalmente rodopsina que disminuyó un 80% a los 180 minutos con respecto a las membranas nativas, en presencia de MT estas alteraciones fueron menos marcadas. Los resultados observados nos permiten concluir que la melatonina ejerce un efecto protector contra el daño oxidativo de lípidos y proteínas de membranas ROS.

296. (7258) MEDICION DE MOVIMIENTOS DE AGUA EN OVOCITOS VACIADOS DE XENOPUS LAEVIS. OZU, MARCELO; DORR, RICARDO; PARISI, MARIO

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, UBA

Una técnica muy utilizada para estudiar funcionalmente proteínas es la inyección de material genético en ovocitos maduros de *Xenopus laevis* para lograr su expresión. Esta técnica, asociada a la videomicroscopía, se usa también para caracterizar los movimientos de agua a través de las acuaporinas (proteínas que funcionan como canales de agua) en la membrana del ovocito. Una limitación de la metodología tradicional es que no puede controlarse el contenido citoplasmático del ovocito. En nuestro laboratorio desarrollamos una nueva técnica donde un ovocito se pega a una lámina de acrílico y se perfora, permitiendo el vaciamiento del contenido celular y la perfusión controlada. Utilizando una cámara del tipo Ussing diseñada especialmente se pudieron seguir los movimientos de agua a través de la membrana plasmática, cuantificando los cambios de posición de la misma. La técnica implica la adquisición de imágenes (hasta 15 por segundo) y su posterior análisis utilizando algoritmos de detección de bordes. Se compararon los movimientos de agua en ovocitos inmaduros (estadio IV) y maduros (estadios V y VI) en condiciones de gradiente osmótico. En los ovocitos inmaduros, donde hay expresión de acuaporinas, se observó un flujo inicial mayor que en los ovocitos maduros, donde los canales de agua no se expresan. La nueva metodología permite también la modificación controlada de la presión en el interior del ovocito. En condiciones hidrostáticas, se hizo evidente la alta distensibilidad de la membrana: al aumentar la presión intracelular se observó una variación del volumen del ovocito vaciado de hasta un 50%. La nueva técnica permite por primera vez realizar mediciones de movimientos de agua a través de la membrana celular del ovocito de *Xenopus laevis* controlando la composición del medio a ambos lados de la misma y la presión hidrostática que se ejerce sobre ella.

297. (7298) CORRIENTES DE CA²⁺ TIPO L Y TIPO T EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA UMBILICAL HUMANA. SALEMME, SILVIA; REBOLLEDO, ALEJANDRO; IVELI, FLORENCIA; SPERONI, FRANCISCO; MILESI, VERÓNICA

Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

La arteria umbilical humana (AUH) desarrolla contracciones que dependen en parte del Ca²⁺ extracelular. En este resumen se describen por primera vez corrientes de Ca²⁺ activadas por voltaje (ICa) en AUH. Mediante la técnica de «patch clamp» se estudiaron células de músculo liso (CML) disociadas enzimáticamente a partir de AUH. Utilizando soluciones intra y extracelulares adecuadas para el aislamiento de ICa (140Cs+/5Ca²⁺+mM, respectivamente) un protocolo de pulsos de voltaje (desde -80 hasta +50 mV) evocó corrientes iónicas con cinéticas de activación e inactivación típicas de ICa. La relación corriente-voltaje (I-V) presentó el máximo de corriente a +20 mV (-61,7±6,7 pA; n=24). Las curvas de activación e inactivación mostraron que el 50% de los canales están activos a potenciales de -9,9±2,2 mV (n=9) e inactivos a un valor de -49,5±2,1 mV (n=7). La ICa es inhibida completamente por el bloqueante de canales de Ca²⁺ tipo L, nifedipina 1 μM (1,1±3,4 vs control -51,7±7,3 pA; p<0,05 n=5 a +20 mV). Para indagar la presencia de canales de Ca²⁺ de tipo T que generalmente producen corrientes de amplitud muy reducida, utilizamos como ion portador de la corriente el Ba²⁺ (30 mM). En estas condiciones el protocolo de voltaje descrito anteriormente evocó una I_{Ba} (a través de canales de Ca²⁺) de mayor magnitud, con un máximo de corriente a +20 mV. La I_{Ba} presentó una componente sensible a la nifedipina 1 μM (control -182,0±22,8 pA vs -19,1±5,6 con nifedipina, p<0,05 n=6 a +20 mV), y otra insensible de menor amplitud la cual resultó inhibida por el bloqueante específico de canales tipo T mibefradil 10 μM (en nifedipina -19,1±5,6 pA vs -3,5±0,6 vs en nifedipina más mibefradil; p<0,05 n=3 a +20 mV). Concluimos que las CML de AUH presentan canales de Ca²⁺ de tipo L y de tipo T, hecho significativo ya que los canales T no están presentes en todos los tipos de CML vascular. Además, recientemente se ha demostrado que la inhibición de su expresión en ratas induce aumentos de la presión arterial in vivo.

298. (7310) ROL DE LA ACUAPORINA 2 EN LA REGULACIÓN DE VOLUMEN CELULAR. FORD, PAULA; RIVAROLA, VALERIA; CHARA, OSVALDO; PARISI, MARIO; CAPURRO, CLAUDIA

Lab. de Biomembranas, Dpto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, (UBA)

Las células de los túbulos colectores (TC) del riñón de mamífero están expuestas a un amplio rango de la osmolaridad extracelular y requieren de importantes mecanismos de regulación de volumen para mantener la homeostasis intracelular. La permeabilidad al agua de estas células es regulada por la hormona antidiurética. Esta hormona induce la incorporación de canales específicos para el transporte de agua (acuaporina 2: AQP2) en la membrana apical de las células principales del TC. El objetivo de este trabajo fue investigar, en presencia de diferentes gradientes osmóticos, la activación de mecanismos de regulación de volumen, en células de TC y el posible rol de la AQP2 en estos procesos. Para ello utilizamos dos líneas celulares derivadas del TC cortical de rata: una de ellas no expresa acuaporinas (WT-RCCD1) y la otra transfectada en forma estable con la AQP2 (AQP2-RCCD1). Los resultados de inmunolocalización muestran que la AQP2 se expresa constitutivamente en la membrana apical. Para la medición del volumen celular utilizamos una técnica de microscopía de fluorescencia la cual permite registrar en forma simultánea volumen y pH en células crecidas formando monocapas. Experimentos con medio hipertónico demostraron que independientemente de la expresión

de la AQP2 las células RCCD1 no desarrollan un mecanismo de regulación del volumen. Por el contrario al someter las células a un gradiente hipotónico se desencadenan mecanismos de regulación del volumen en ambas líneas celulares. Sin embargo, el tiempo que tardan en alcanzar el máximo volumen y la latencia antes de comenzar la regulación es significativamente menor en las células que expresan AQP2 ($p < 0.001$). Esta respuesta reguladora ocurre en paralelo con una acidificación intracelular la cual es mas rápida en AQP2-RCCD1 ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que la expresión de AQP2 es fundamental para una rápida activación de los mecanismos de regulación de volumen.

299. (7554) EFECTO DE CATIONES SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA CA-ATPasa DE RETÍCULO SARCOPLÁSMICO POR CARTICAÍNA. TAKARA, DELIA; SÁNCHEZ, GABRIEL A; BONAZZOLA, PATRICIA; ALONSO, GUILLERMO L

Cátedra de Biofísica, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires

La carticaína inhibe la Ca-ATPasa del retículo sarcoplásmico (RS) (Takara et al, NS Arch. Pharmacol 362: 497, 2000). En SAB 2002 presentamos un modelo del mecanismo de inhibición basado en la competencia entre el anestésico y Ca^{2+} por la enzima libre de ligandos. Aquí aportamos evidencias adicionales a favor del mecanismo propuesto, estudiando los efectos de Mg^{2+} y H^+ sobre la inhibición de la fosforilación de la Ca-ATPasa por carticaína. Membranas de RS de músculos esqueléticos rápidos de conejo se aislaron por centrifugación diferencial, como vesículas con actividad Ca-ATPásica y capacidad de acumular Ca^{2+} en presencia de ATP. Se midió actividad ATPásica en presencia de Ca-EGTA, $MgCl_2$, KCl, ionóforo A23187 y ATP a varios pHs, y fosforilación de la Ca-ATPasa en ausencia de Ca, ionóforo y ATP, con Pi (32P), a pH 5.9 y varias $[Ca^{2+}]_i$. El pKi para carticaína disminuye a pHs menores a 7.2 (1.55–1.38 en el rango de pH 7.2–5.5). A $[MgCl_2]$ óptimas (3 mM) el patrón de las curvas con y sin carticaína es similar. A $[MgCl_2]$ elevadas (20 mM), la carticaína no inhibe la actividad ATPásica. Esto indica que el efecto de Mg sobre el sitio de transporte antagoniza el efecto de carticaína sobre el mismo sitio y no afecta el sitio catalítico. Mg inhibe competitivamente el efecto de la carticaína sobre la fosforilación por Pi: $Kap(\text{carticaína}) = 3,19 \pm 0,15 - 43,72 \pm 8,36$ mM para 0,5–6 mM $MgCl_2$ y $Kap(MgCl_2) = 2,86 \pm 0,40 - 6,21 \pm 1,00$ para 0–45 mM carticaína. Los resultados indican que Mg compete con el efecto inhibitorio de la carticaína sobre la fosforilación. Para el H^+ el mecanismo es más complejo dado que el pH del medio determina la forma predominante del anestésico. Se presenta un modelo de reacción de la carticaína con la Ca-ATPasa que unifica los efectos del Ca^{2+} y estos resultados. El modelo también es coherente con resultados previos de nuestro laboratorio, referentes al efecto de Pi sobre la inhibición de la Ca-ATPasa por carticaína, los que también se incorporan al modelo. Subsidios UBA, CONICET.

300. (7654) EFECTOS DE LA ACIDOSIS Y LA ALCALOSIS SOBRE EL INTERCAMBIADOR Cl^-/HCO_3^- EN CÉLULAS DE TÚBULO COLECTOR RENAL. RIVAROLA, VALERIA; FORD, PAULA; CHARA, OSVALDO; PARISI, MARIO; CAPURRO, CLAUDIA

Laboratorio de Biomembranas. Departamento de Fisiología y Biofísica. Facultad de Medicina. UBA

Los túbulos colectores del riñón de mamífero juegan un papel central en el mantenimiento del equilibrio ácido-base. Por ende, allí, la homeostasis del pH intracelular (pHi) es crítica. Uno de los transportadores especializados en la regulación de este equilibrio es el intercambiador Cl^-/HCO_3^- (AE). Si bien se ha reportado como afectan los desbalances ácido-base la expresión de la isoforma AE1, poco se sabe acerca de la regulación de las otras isoformas descriptas para el transportador (AE2-4). El objetivo de este trabajo fue caracterizar, en la línea celular RCCD[1] (modelo de túbulo colector), que isoformas del intercambiador Cl^-/HCO_3^- se expresan y la influencia de los desbalances áci-

do-base en la regulación de las mismas. El pHi se estudió, utilizando el fluoróforo BCECF por espectrofluorometría. Las células no mostraron capacidad de regular su pHi tras 1 hora de incubación en medios ácidos o alcalino (control $7,51 \pm 0,04$, ácido $7,17 \pm 0,05$, alcalino $7,71 \pm 0,04$; $p < 0,001$ $n=15$ en ambos casos). Por el contrario, al extender el período de incubación a 48 horas los pHi no fueron significativamente distintos del control. Se evaluó la velocidad de transporte de las AEs utilizando un protocolo de remoción de Cl^- . La actividad de los transportadores en ambas situaciones de acidosis (1 y 48 hs) no resultó significativamente distinta del control. Por otra parte, en alcalosis la actividad resultó significativamente aumentada ($p < 0.02$ $n=15$ a 1 hs; $p < 0,05$ $n=18$ a 48 hs). Además, la velocidad de transporte de las AEs fue dependiente del pH extracelular. Los estudios de Western Blot mostraron la expresión de las isoformas AE2 y AE4. Al analizar la regulación de la expresión se pudo comprobar que AE2, pero no AE4, aumentaba su expresión solo tras 48 hs de alcalosis ($p < 0.05$). Podemos concluir que las células RCCD[1] son capaces de regular su pHi tras una alcalosis crónica debido a una regulación de la expresión de la isoforma AE2.

301. (7711) ACTIVACIÓN DE LA PMCA POR DILUCIÓN. ESTUDIO EN MICROSOMAS DE CÉLULAS DE INSECTO. VANAGAS, LAURA; CARIDE, ARIEL*; ROSSI, JUAN PABLO.

*Iquifib. F.F y B; *Department Of Biochem. and Molecular Biology, Mayo Foundation, Rochester, Mn.*

La bomba de calcio de membrana plasmática (PMCA), es una proteína de 127000-134000 que se encuentra en todas las células eucariotas. Es una P-ATPasa regulada por calmodulina, fosfolípidos ácidos, proteínas quinasas, etc., codificada por una familia de multigenes. La PMCA no supera el 0.1% del total de proteínas de membrana, por lo que resulta difícil estudiarla en su entorno natural. Hemos descrito el efecto de la dilución de suspensiones de membranas de eritrocitos humanos, lo que produce la activación específica de la PMCA (Congreso SABSALBMB, 2003). Recientemente se han sobre-expresado diferentes isoformas de PMCA en células de insecto (Sf9 y Sf21) mediante un baculovirus que produce una preparación de alta actividad específica. Este estudio se efectuó en preparaciones microsomales de Sf9 o Sf21 de la isoforma h4b, predominante en eritrocitos humanos. Se realizaron medidas de actividad enzimática, (Fiske y Subbarrow y Baginski), variando la concentración de proteínas totales lo que produce un aumento de la actividad específica entre 1.5 y 6 veces en las suspensiones diluidas respecto de las concentradas. Este efecto se manifiesta tanto en ausencia como en presencia de concentraciones saturantes de calmodulina. El estudio de la actividad de Ca^{2+} -ATPasa, mediante el método cinético de Webb (PNAS, 89, 884, 1992) mostró que la actividad específica aumenta significativamente con la dilución de 0.02 a 0.038 $\mu\text{mol Pi.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$ en 9.2 y 46 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas totales, respectivamente, y, con el agregado de calmodulina, de 0.099 a 0.189 $\mu\text{mol Pi.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$. La constante de activación por calmodulina fue de 0.012 y 0.035 s⁻¹. Resultados preliminares indican que este fenómeno también aparece en la isoforma 2b. El fenómeno puede describirse como una actividad bifásica (activación- inhibición) dependiente del grado de expresión de la PMCA e independiente de la concentración de Ca^{2+} y calmodulina.

302. (7728) ESTUDIO DE LA UBICACIÓN Y REGULACIÓN DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ EN UNA LÍNEA CELULAR DE INTESTINO HUMANO. TORIANO, ROXANA; PARISI, MARIO

Lab de Biomembranas. Dpto de Fisiología y Biofísica. Facultad de Medicina. UBA

En términos generales la regulación del pH intracelular (pHi) estaría a cargo de los intercambiadores Na^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- y de bombas que excretan protones. No obstante, la ubicación y la función específica de estas proteínas es aun objeto de discu-

sión. Nuestros estudios previos mostraron que en las células T84, derivadas de colon humano y modelo de epitelio intestinal, la recuperación del pHi luego de una carga ácida es dependiente de Na. Esto nos sugirió la presencia del intercambiador Na⁺/H⁺ en T84. El presente trabajo estudia la expresión, regulación y ubicación en la célula polarizada, del intercambiador Na⁺/H⁺. Las células fueron cultivadas sobre soporte permeable, cargadas con BCECF/AM y colocadas en una cámara que permite el acceso independiente al lado apical (AP) y basolateral (BL) de las células. El pHi se midió por espectrofluorometría en distintas condiciones: basal; en ausencia de sodio (0Na) AP y/o BL y luego de una carga ácida. Además estudiamos el efecto de uroguanilín, un péptido que se propone como eje de unión exocrina entre intestino y riñón en el mantenimiento del balance de Na y por tanto de agua, sobre la recuperación del pHi. El pHi basal de T84 fue de $7,44 \pm 0,047$ (n=35). La condición 0Na BL acidificó significativamente el pHi respecto del control (p<0.02), mientras que la condición 0Na AP alcalinizó levemente el pHi. Utilizando la técnica de western blot con anticuerpos específicos se pudo probar que las células T84 expresan la isoforma NHE1 del intercambiador. Durante la estimulación con uroguanilín luego de un pulso de amonio, se observó que las células alcanzaban un pHi menor respecto de la condición control, si se estimulaban del lado BL que si se estimulaban del lado AP (p<0.05). Además las células estimuladas del lado AP mostraron una mayor velocidad de recuperación que al ser estimuladas del lado BL, donde fue necesario volver a la condición control para observar recuperación. Se puede concluir que NHE1 se expresaría del lado basolateral en T84, cumpliendo un rol en el mantenimiento del pHi basal.

303. (8000) EFECTO DEL ETANOL SOBRE EL MÚSCULO LISO VASCULAR DE ARTERIA UMBILICAL HUMANA. IVELI, FLORENCIA; SALEMME, SILVIA; REBOLLEDO, ALEJANDRO; GENDE, ALFREDO; MILESI, VERÓNICA

Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

En diferentes vasos sanguíneos han sido descriptos efectos contráctiles y relajantes del etanol (EtOH). En este trabajo se estudió el efecto del EtOH (100 y 200 mM) sobre el desarrollo de fuerza isométrica de segmentos de arteria umbilical humana (AUH). Además, mediante la técnica de «patch-clamp» se ensayó en células de músculo liso aisladas el efecto del EtOH sobre la corriente de Ca²⁺. Resultados: el 75% de los segmentos estudiados (n=64 totales) desarrollaron una contracción activa y estable cuando fueron estirados inicialmente a 2 gF. En estos anillos, el EtOH (100 y 200 mM) produjo una relajación de la contracción inicial independiente de la dosis ensayada ($-20,2 \pm 7,3$ n=7 p<0,05 y $-31,3 \pm 11,0$ gF/gP n=7 p<0.05 por Anova, respectivamente). Las mismas dosis de EtOH ensayadas sobre anillos preincubados con L-NAME e indometacina (inhibidores de la producción de factores relajantes como el NO y prostaciclina, respectivamente) no produjeron relajación ($3,2 \pm 7,1$ y $-1,1 \pm 3,2$ gF/gP n=7, p<0,05 vs no preincubados). En ambos grupos el agregado de una solución despolarizante de alto K⁺ evocó una contracción dependiente de la concentración de EtOH ($96,2 \pm 17,3$ n=11 y $70,4 \pm 14,8$ gF/gP n=9 p<0,05) que no fue afectada por la presencia de L-NAME e indometacina (por Anova vs no preincubados). El lavado del EtOH aumentó significativamente la contracción tanto en los no preincubados ($41,9 \pm 15,3$ y $106,4 \pm 33,4$ % de aumento, p<0,05) como en los preincubados ($18,5 \pm 3,3$ y $62,7 \pm 15,9$ % de aumento, p<0,05). En anillos estimulados con serotonina el EtOH (200 mM) también produjo relajación del anillo vascular ($112,6 \pm 36,4$ % n=8, p<0,05). En células aisladas el EtOH (100mM) inhibió la corriente de Ca²⁺ de tipo L ($55,4 \pm 16,1$ % de inhibición a +20mV, n=3 p<0,05). Concluimos que en la AUH el EtOH relaja el tono basal y deprime las contracciones inducidas por alto K⁺ y por serotonina. Los resultados sugieren que en el mecanismo de relajación participan el NO y la prostaciclina y el efecto inhibitorio del EtOH sobre canales de Ca²⁺ de tipo L.

304. (8130) ALTERACIÓN EN LA FOSFORILACIÓN PROTEICA EN RESIDUOS TIROSINA Y LOS CAMBIOS EN LA FLUIDEZ DE MEMBRANA ASOCIADOS A LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN PACIENTES ASTENOZOOSPÉRMICOS. BUFFONE, MARIANO; CALAMERA, J.C.; VERSTRAETEN, S.V.; DONCEL, G.F.

Laboratorio de Estudios en Reproducción (LER), Buenos Aires, Argentina; IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. CONRAD, Eastern Virginia Medical School, USA.

La capacitación es un proceso esencial para que el espermatozoide adquiera capacidad fertilizante. Numerosos cambios en los espermatozoides han sido asociados con este proceso, entre los que podemos asociar a la fosforilación proteica en residuos tirosina, la hiperactivación y la disminución en la fluidez de membrana. Nuestro objetivo fue caracterizar los cambios en la fosforilación en proteínas en tirosina y la fluidez de membrana asociados a la capacitación en muestras de pacientes astenozoospermicos (AST) y compararlos con el comportamiento de muestras de individuos normozoospermicos (NOR). Se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica y Western blot para la detección de proteínas fosforiladas en tirosina, la polarización generalizada de la sonda Laurdan para evaluar la fluidez de membrana, y videomicrografía computarizada para la hiperactivación. En comparación con el grupo NOR, los AST mostraron una marcada incapacidad de fosforilar proteínas en tirosina y de desarrollar movilidad hiperactivada. Esta imposibilidad pudo ser revertida con la estimulación de la PKA con dbAMPc y pentoxifilina. Además, los AST mostraron menor fluidez de membrana que los NOR, tanto antes como después de la capacitación. Los pacientes AST tienen una alteración en la fosforilación de proteínas, efecto causado parcialmente por la menor fluidez de membrana detectada en los espermatozoides. Esto contribuirá al entendimiento de los mecanismos moleculares para una mejor caracterización de este tipo de alteraciones andrológicas.

305. (8131) IMPORTANCIA DE LOS CAMBIOS EN LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA CAPACIDAD FERTILIZANTE DE LOS ESPERMATOZOIDES. BUFFONE, MARIANO; CALAMERA, J.C.; DONCEL, G.F.; VERSTRAETEN, S.V.

Laboratorio de Estudios en Reproducción (LER), Buenos Aires, Argentina IQUIFIB, (CONICET-UBA). CONRAD, Eastern Virginia Medical School, USA

A fin de adquirir capacidad fertilizante, los espermatozoides humanos experimentan una serie de cambios. En este proceso, denominado capacitación, a partir de la membrana plasmática (MP) se libera colesterol. Dada la relevancia del colesterol en la regulación de la fluidez de la MP, investigamos la fluidez de la MP antes y después de la capacitación espermática en espermatozoides de distinta calidad funcional provenientes de individuos normozoospermicos (NOR) y astenozoospermicos (AST). Utilizamos las siguientes sondas fluorescentes: (a) DPH, que evalúa la fluidez en las regiones hidrofóbicas de la bicapa, (b) TMA-DPH y PA-DPH que se insertan en la hemicapa exofacial y citosólica de la MP, respectivamente, y (d) Laurdan, sensible al contenido de agua en la bicapa. Previamente a la capacitación no se observaron diferencias significativas en la fluidez entre NOR y AST evaluada con DPH, PA-DPH o TMA-DPH en las distintas fracciones celulares. Sin embargo encontramos una mayor hidratación de la MP en los AST. En las fracciones de la mejor calidad funcional provenientes de individuos NOR encontramos una mayor fluidez de la MP luego de la capacitación, efecto que si bien se evidenció con todas las sondas utilizadas fue mayor al utilizar las sondas PA-DPH y TMA-DPH. Por el contrario, en espermatozoides AST no se observaron cambios significativos en la fluidez en ninguna de las fracciones investigadas.

Los resultados del presente trabajo muestran que en condiciones normales el proceso de capacitación conduce a la alteración de la reología de la MP espermática. Estos cambios estarían relacionados con la capacidad fertilizante de los espermatozoides, ya que en muestras de pacientes AST, los cuales poseen una menor capacidad fertilizante, no se observan cambios en la fluidez de la MP asociados a la capacitación, comportándose como las células de menor calidad fertilizante en los individuos NOR.

COMUNICACIÓN INTERCELULAR 3: TRANSPORTADORES Y CANALES

306. (6660) LA TROMBINA ACTIVA EL INTERCAMBIO ANIONICO EN PLAQUETAS HUMANAS. GENDE, OSCAR ALFREDO

Centro Investigaciones Cardiovasculares. UNLP

En las plaquetas sanguíneas se han caracterizado el intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE) y el cotransportador sodio-bicarbonato que, frente a una carga ácida, elevan el pH intracelular (pHi), pero la presencia de un intercambiador de aniones (AE) activado por alcalosis no ha sido descrito previamente. Cuando plaquetas cargadas con el indicador fluorescente BCECF se resuspendieron en una solución salina con bicarbonato y sin cloruro, su pHi se elevó. El agregado de gluconato de sodio 50 mM no provocó recuperación de la carga alcalina pero con LiCl, NaCl o NaCl e inhidor del NHE (EIPA), el pHi se redujo significativamente (tabla). La recuperación del pHi luego de la alcalinización por cloruro de trimetilamina 25 mM fue más rápida cuando las plaquetas se estimularon con 0.1 UI de trombina (en pH.10(4)/seg: 5.7 ± 0.7 vs 13.5 ± 1.3; P<0.05). El aumento de velocidad de recuperación del pHi provocado por trombina se produjo sólo si la solución contenía bicarbonato y se mantuvo cuando se inhibió el NHE (7.6 ± 1.2 vs 13.4 ± 1.3; P<0.05).

Soluciones	Na 50 mM	Li Cl Gluconato	Na Cl	Na Cl +EIPA
pHi antes	7.63 ± 0.03	7.62 ± 0.02	7.66 ± 0.01	7.66 ± 0.04
pHi despues	7.64 ± 0.04	7.51 ± 0.04 *	7.54 ± 0.03 *	7.53 ± 0.03 *

Los cambios de pHi en las plaquetas frente a los cambios de concentración de Cl⁻ y HCO₃⁻ corresponden a la presencia de un AE. Este intercambiador es estimulado por trombina. Dado que la trombina provoca la alcalinización intracelular por estimulación del NHE, este cambio de pHi podría ser detectado por el AE y provocar indirectamente un aumento de su actividad. Pero como la estimulación del AE ocurre aun en presencia de inhibidores del NHE se concluye que existe una vía directa por la que trombina estimula al AE. Puede sorprender el hecho de que un mismo agonista fisiológico active simultáneamente dos intercambiadores que regulan el pHi en dirección opuesta, pero este patrón de doble estimulación directa parece aplicarse también a otros tipos celulares.

307. (6751) INTERACCIÓN ENTRE NA⁺ Y RB⁺ EN LA NA⁺/K⁺-ATPasa. MONTI, JLE; SCHVARTZ, PG; GONZALEZ-LEBRERO, RM; KAUFMAN, SB; GARRAHAN, PJ; ROSSI, RC

IQUIFIB, Depto. de Química Biológica, Facultad Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

La Na⁺/K⁺-ATPasa es una proteína integral de membrana que acopla la hidrólisis de una molécula de ATP al intercambio de 3 Na⁺ del citoplasma por 2 K⁺ del medio extracelular. Su mecanismo catalítico no se conoce claramente. Existen intermediarios de reacción en los que el K⁺ se halla ocluido (atrapado por la enzima). Con el fin de estudiar la interacción entre Na⁺ y Rb⁺ (un análogo del K⁺) con la enzima, se realizaron determinaciones de [86Rb]Rb⁺ ocluido (Rb-ocl). Se usó enzima purificada de la médula externa de riñón de cerdo. Las reacciones se realizaron a

25°C en medios conteniendo: enzima 37µg/ml, imidazol 25mM, EDTA 0.25mM, pH 7.4 a 25°C, 0.5mM de Mg²⁺ libre, Colina-Cl para mantener constante la fuerza iónica, y distintas concentraciones de ATP, NaCl y [86Rb]RbCl. Las reacciones se frenaron a los 10 segundos de iniciadas con una solución fría de KCl 30mM, imidazol 5mM, pH 7.4 a 2-4°C, y la mezcla se filtró para retener la enzima con el [86Rb]Rb⁺ ocluido. Los resultados muestran que, a una concentración fija de Rb⁺ y concentraciones crecientes de Na⁺, Rb-ocl aumenta sigmoidalmente hasta alcanzar un máximo para luego caer hiperbólicamente a un valor distinto de cero. El ajuste de una ecuación de Hill a la parte sigmoidea de la curva muestra que el nH es cercano a 3 en todos los casos, coincidiendo con la estequiometría de la reacción, mientras que la K_h aumenta en forma saturable al incrementarse la concentración de Rb⁺ de 5 a 245µM. A 10µM ATP, los resultados muestran que los valores de K_{0.5} de la caída hiperbólica aumentan linealmente con la concentración de Rb⁺, así como el nivel de Rb-ocl medido en ausencia de Na⁺. Los resultados pueden en general ser explicados por el modelo cinético aceptado actualmente (modelo de Albers-Post), a excepción de la caída de Rb-ocl a un valor distinto de cero cuando la concentración de Na⁺ tiende a infinito. Dicho modelo plantea que el Na⁺ compite con el Rb⁺ por los sitios de oclusión y, si esto fuera cierto, Rb-ocl debería tender a cero a medida que aumenta la concentración de Na⁺. (UBA-CONICET)

308. (6843) EL CANAL DE CL⁻ CFTR, AFECTADO EN FIBROSIS QUÍSTICA, REGULA LA PROTEÍNA ND4, UNA SUBUNIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL QUE ES CLAVE PARA EL TRANSPORTE DE ELECTRONES. VALDIVIESO, ANGEL GABRIEL; MARCUCCI, FLORENCIA; TAMINELLI, GUILLERMO; REYES, G. BEATRIZ; DANKERT, MARCELO A.; SANTA COLOMA, TOMÁS A.

IIB-UBA, IIBBA-CONICET, Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina

La Fibrosis Quística (FQ) es producida por mutaciones en el canal de cloruro CFTR. Nuestro objetivo es estudiar genes CFTR-dependientes, para identificar las vías de señalización afectadas. Mediante display diferencial hemos identificado a la subunidad ND4 del Complejo I mitocondrial (CIm) como CFTR-dependiente. Mediante Northern blots en líneas celulares e hibridaciones in situ sobre cortes de pulmones normales y FQ, se ha confirmado la regulación negativa del ARNm de ND4 en FQ. Nuestro objetivo ahora es determinar si la modulación del ARNm se refleja en los niveles de la proteína ND4 y si esta disminución afecta la actividad del CIm. Se usó la técnica Blue Native-PAGEs para medir la actividad del CIm en mitocondrias extraídas de células CFDE (FQ), de las mismas células transfectadas para que expresen CFTR wt (CFDE/6RepCFTR) y de células T84 de cáncer de colon (CFTRwt). Se observó una disminución de la actividad del CIm (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) cuando estas células fueron incubadas con glibenclamida (inhibidor del CFTR, 100 mM), confirmando que la actividad del CFTR regula la actividad del CIm. Los resultados obtenidos sugieren una alteración en la actividad del CIm debida a la disminución de la proteína ND4. Esto explicaría las anomalías mitocondriales descritas en FQ por otros autores, para las cuales se desconoce el mecanismo. A su vez, abre el camino hacia el estudio de la regulación de genes mitocondriales y hacia la identificación de nuevos posibles blancos de terapia. Agradecimientos: Universidad de Buenos Aires, CONICET y Beca Carrillo-Oñativia del Ministerio de Salud.

309. (6907) KLPX ES UNA PROTEÍNA DE LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL, CON UN DOMINIO «ZN FINGER» SIMILAR AL DE ALGUNAS KINESINAS, Y CUYA EXPRESIÓN ESTÁ DISMINUIDA EN FIBROSIS QUÍSTICA. TAMINELLI, GUILLERMO L.; SOTOMAYOR, VERÓNICA; VALDIVIESO, A. GABRIEL; REYES, G. BEATRIZ; DANKERT, MARCELO A.; SANTA COLOMA, TOMÁS A.

IIB-FCEyN-UBA, IIBBA (CONICET), Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina

Anteriormente demostramos una relación causal entre la falla del CFTR y el nivel de expresión aumentado de la tirosinkinasa c-Src, en tejido pulmonar y líneas celulares provenientes de pacientes con fibrosis quística (FQ). Así, c-Src constituye un puente entre la sobreproducción de mucus y la falla del CFTR (J. Biol. Chem. 2002, 277:17239-47). Ahora, nuevamente mediante display diferencial, hemos caracterizado un nuevo gen dependiente del CFTR, KLPx, el cual codifica una proteína de función desconocida que posee un dominio Zn-Finger del tipo CDGSH. El ARNm de KLPx está modulado negativamente en células CFDE y los niveles son restaurados en células CFDE transfectadas con CFTR wt (células CFDE/6RepCFTR). Los resultados fueron confirmados mediante Northern Blots y FISH Confocal. El tratamiento con glibenclamida (inhibidor del CFTR, 50 mM) de células CFDE/6RepCFTR y CFDE, produjo una reducción en los niveles del ARNm de KLPx. La secuencia proteica predicha tiene un motivo de translocación mitocondrial y un motivo similar a ND2, una subunidad del Complejo I mitocondrial. La predicción de la localización subcelular de la proteína fue realizada mediante el programa PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>). Utilizando una quimera de la proteína KLPx unida a GFP y microscopía confocal, hemos observado que la predicción de su localización es correcta. Los resultados sugieren que KLPx tendría una localización mitocondrial, una probable función como factor de transcripción y que se encontraría en disminuida FQ, como ocurre con la actividad mitocondrial. Agradecimientos: Universidad de Buenos Aires, CONICET, y Beca Carrillo-Oñativia del Ministerio de Salud.

310. (7039) CORRIENTES ANIÓNICAS AMPc-DEPENDIENTES EN CÉLULAS K562 SALVAJES Y RESISTENTES A VINCRISTINA. ASSEF, YANINA (1); CAVARRA, SOLEDAD (1); DAMIANO, ALICIA (2); IBARRA, CRISTINA (2); KOTSIAS, BASILIO A. (1)

(1) *Lab. Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari;* (2) *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

En este trabajo estudiamos la función de las proteínas ORCC (canal de cloruro con rectificación saliente) y CFTR (regulador transmembrana de la fibrosis quística) en células K562 salvajes (K562WT) y resistentes a vincristina (K562Vinc). La expresión de los genes que codifican para CFTR y MDR-1 (multidroga resistencia) se evaluó por RT-PCR semicuantitativa. El ARNm de MDR-1 aumentó 20 veces en las células K562Vinc con respecto a las salvajes, mientras que no se observan cambios en los niveles de CFTR. La actividad de los canales ORCC y CFTR fue estudiada con técnica de patch clamp en configuración de célula entera. La forskolina (40 μ M), un activador de la adenilato ciclasa, incrementó las corrientes salientes en los dos tipos celulares. Los valores de conductancia (0 - 80 mV) en K562WT fueron: 0.47 ± 0.09 y 1.06 ± 0.24 nS en condiciones control y estimulada, respectivamente ($p < 0.05$, $n=9$). En las K562Vinc la conductancia control fue 0.32 ± 0.08 nS y 0.67 ± 0.15 nS después de la activación ($p < 0.05$, $n=12$). El efecto de la forskolina fue evitado por exposición previa de las células a DPC (diphenylamine-2-carboxylate). Una fracción de las corrientes activadas por forskolina pudo ser inhibida por 500 μ M DIDS (4,4-diisothiociyanatostilbene-2,2-disulfonic acid) y la subsecuente adición de 500 μ M DPC bloqueó la fracción remanente. Los niveles de corrientes AMPc-dependientes y de inhibición fueron similares en los dos tipos celulares. El efecto de DIDS y DPC aplicados extracelularmente nos permite concluir que aproximadamente el 70% de la corriente estimulada en ambas líneas celulares sería transportada por canales ORCC y la remanente a través de CFTR. Finalmente, pudimos observar que la sobreexpresión de MDR-1 en células K562 no está acompañada de una disminución de la expresión y/o funcionalidad de CFTR, como en la mayor parte de los tipos celulares estudiados.

311. (7152) ESTUDIO CINÉTICO DE LA NA, K-ATPasa USANDO LA Sonda FLUORESCENTE RH421. SCHVARTZ, PG;

MONTI, JLE; GONZÁLEZ-LEBRERO, RM; KAUFMAN, SB; GARRAHAN, PJ; ROSSI, RC

IQUIFIB, Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

La Na,K-ATPasa es una proteína de membrana que acopla el intercambio de Na(+) por K(+) a la hidrólisis de ATP. Durante el ciclo de reacción se forman intermediarios fosforilados en dos estados conformacionales de la enzima, denominados E1P y E2P. La concentración total de los estados fosforilados puede ser medida utilizando $[\gamma\text{-}(32)\text{P}]\text{ATP}$. Recientemente hemos comenzado a utilizar la sonda fluorescente RH 421 que detectaría exclusivamente el conformero E2P. El objetivo del presente trabajo es estudiar la fluorescencia de la sonda RH421 en la Na+/K+-ATPasa, con el fin de evaluar su utilidad para dilucidar el mecanismo cinético de la enzima. Utilizando un fluorómetro de «stopped flow» y trabajando a 25°C, se obtuvieron registros de fluorescencia de RH421 en función del tiempo luego de mezclar la enzima con ATP en diferentes concentraciones. El medio final contenía Na(+) 150 mM, Mg(2+) 0.5 mM e Imidazol-HCl 25 mM, pH=7.5. Los resultados muestran que al agregar ATP la fluorescencia aumenta rápidamente, manteniéndose alta hasta caer abruptamente. La caída se debería al consumo del ATP ya que desaparece en presencia de un sistema regenerador. El aumento de fluorescencia parece reflejar la formación de E2P ya que el agregado de oligomicina, que bloquea el cambio conformacional E1P->E2P sin impedir la formación de E1P, lo anula completamente. De registros obtenidos con [ATP] entre 0.1 y 50 μ M, se obtuvieron el cambio máximo de fluorescencia y, gracias a un procedimiento desarrollado por nosotros, también la actividad ATPasa. Ambas magnitudes presentan un comportamiento hiperbólico respecto a la concentración de ATP, siendo sus $K_{0.5}$ idénticos y comparables a los hallados en bibliografía y a medidas previas generadas en nuestro laboratorio. Podemos concluir que el estado de alta fluorescencia corresponde a un intermediario obligatorio del ciclo catalítico, posiblemente E2P, y que la sonda RH421 permite estimar la actividad ATPasa. Financian: UBA, ANPCyT, CONICET y F. ANTORCHAS.

312. (7508) CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTE DE L-ARGININA EN CÉLULAS ADRENALES. PANNUNZIO, VANESA; POMERANIEC, YAL; PIGNATARO, OMAR; CYMERYNG, CORA

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA; IBYME-CONICET

Se ha demostrado que diversos factores, actuando en forma autócrina o parácrina modulan el efecto de ACTH sobre la fisiología adrenal. Uno de éstos factores es el óxido nítrico (NO), inhibidor de la esteroidogénesis adrenal. Dado que resultados previos indicaron que ACTH aumenta el transporte de arginina y la producción de nitritos (producto de degradación del NO) en células adrenales, el objetivo de éste trabajo fue caracterizar el sistema de transporte de arginina, sustrato para la síntesis de NO. Para ello se determinó el transporte de arginina: a) en presencia de aminoácidos neutros y catiónicos como leucina, glutamina y lisina, en medio con y sin sodio, b) luego de la preincubación con NEM, y c) en presencia de cistina, en medio con y sin sodio. Los resultados indicaron que en condiciones basales (y en forma similar para ACTH) la leucina inhibió el transporte de arginina (en pmoles/min/mg) (C: 2430.9 ± 244.6 ; Leu 1 mM: 843.7 ± 68.2 $p < 0.01$) mientras que en colina la inhibición fue significativamente menor (ns para los controles; ACTH: 3889.4 ± 350.5 ; ACTH + Leu 1 mM: 2022.5 ± 280.6 ; $p < 0.01$). En medio con sodio la cistina inhibió el transporte un 30% (cistina 1 mM: 1699.1 ± 151.7 $p < 0.01$) mientras que en medio con colina la inhibición fue del 60% en los controles (cistina 1 mM: 998.6 ± 180.3 $p < 0.01$) y del 85% para ACTH (cistina 1 mM: 577.6 ± 230.3 ; $p < 0.01$). La inhibición con NEM se observó sólo cuando la concentración de arginina fue de 5 μ M. Los RT-PCR mostraron la expresión de CAT-1, CAT-2, y((+))-LAT1, y((+))-LAT-2,

CD98 y b(0,+). Los estudios cinéticos indicaron la presencia de al menos dos sistemas transporte con diferentes constantes de afinidad. Los resultados sugieren la coexistencia de al menos tres sistemas de transporte de arginina, el y+, que funciona a a bajas concentraciones de sustrato y los sistemas y(+)L y b(0,+) que son activos a concentraciones mayores de arginina. En presencia de ACTH se detecta una mayor actividad del sistema que transporta aminoácidos neutros en forma independiente de sodio.

313. (7752) DETECCIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL TRANSPORTE DE SODIO EN UNA LÍNEA CELULAR DE CORIOCARCINOMA HUMANO (BEWO). DEL MÓNACO, SILVANA (1,2); DAMIANO, ALICIA (2); ZOTTA, ELSA (2); IBARRA, CRISTINA (2); KOTSIAS, BASILIO (1)

(1) *Lab. de Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari;* (2) *Lab. de Fisiopatología, Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA, Argentina*

Nuestro trabajo consiste en la detección molecular del canal epitelial de Na(+) ENaC y la proteína APXL (Apical protein of *Xenopus Like*), relacionada con el transporte de Na(+), en la línea celular BeWo derivada de coriocarcinoma humano. Ya demostramos la presencia de ENaC y APXL en sinciotrofoblasto de placenta humana. Cambios en la expresión de las mismas pueden estar relacionadas con la patogenia de hipertensión arterial inducida por el embarazo (preeclampsia). Para analizar con técnicas electrofisiológicas la función que cumplen estas proteínas utilizaremos a las células BeWo como modelo de transporte placentario. Se purificó ARN total de células BeWo, placentas normales y preeclámpicas. Por RT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para las tres subunidades (alpha, beta y gamma) del ENaC y APXL, analizamos la expresión de las proteínas en la línea celular. Los resultados revelaron que aENaC y APXL se sintetizan en estas células. El tratamiento de las células con vasopresina 10(-7) M (6 horas) no modificó este patrón de expresión. Con un western blot de proteínas de membrana de células BeWo, utilizando un anticuerpo policlonal anti-APX se observó una importante banda de ~160 kDa, similar a la proteína APXL de retina humana. Con una RT-PCR semicuantitativa detectamos una disminución cercana al 50% en la relación APXL/actina en ARN total de placentas preeclámpicas (n = 2) con respecto a placentas normales (n = 3), (0.22 ± 0.012 y 0.59 ± 0.35, respectivamente). Los resultados obtenidos nos permiten adoptar a las células BeWo como un modelo para el estudio del transporte de Na(+) placentario por ENaC y APXL. Los estudios futuros contribuirán a dilucidar los mecanismos involucrados en el movimiento de sodio y su regulación, y permitirán estudiar estas proteínas en placentas humanas preeclámpicas para entender mejor la fisiopatología de este desorden.

314. (7763) OBTENCIÓN DE PREPARACIONES MEJORADAS DE PMCA EXPRESADA EN LÍNEAS CELULARES DE SPODOPTERA FRUGIPERDA (SF21). SAMSA, MARCELO M.; ROSSI, J.P.F.C

IQUIFIB. FF y B, Junín 956. Buenos Aires, Argentina

La bomba de calcio de la membrana plasmática (PMCA) es una proteína de 127000-134000 que se encuentra en todas las células eucariotas. Es una P-ATPasa codificada por una familia de multigenes que en ningún caso supera el 0.1% del total de proteínas de membrana, por lo que es necesario purificarla o sobreexpresarla en sistemas adecuados para poder estudiar su estructura y efectuar algunas determinaciones funcionales. Para obtener preparaciones de alta actividad específica, estamos implementando la expresión de PMCA mediante baculovirus recombinantes de las isoformas rPMCA2b y hPMCA4b bajo la regulación del promotor de polihedrina en Sf21 en colaboración con la Mayo Clinic Foundation (Rochester, MN). Con este material hemos expresado y preparado microsomas, con una actividad ATPasa en ausencia de calmodulina de 9.85 umol Pi hr-1 mg-1 para la isoforma r2b y 6.7 umol Pi hr-1 mg-1 para la isoforma h4b respecto a proteínas totales, las cuales son simi-

lares a las informadas en la literatura científica. Cuando realizamos un seguimiento de la actividad sobre la isoforma r2b a intervalos de tiempo de 24 hs post-infección, hemos visto un alto nivel de expresión en los días 2 y 3 alcanzando más de un 30 % de PMCA respecto al total de proteínas, mientras que en células sin infectar el porcentaje determinado fue del 0.1%. No obstante estos valores de actividad alcanzados respecto a proteínas totales, solo fueron triplicados en los días 2 y 3, mientras que la actividad específica de PMCA fue significativamente menor respecto del control, alcanzando un máximo en el día 4 post-infección. Estos resultados indican que la mayor parte de la proteína expresada se encuentra en forma inactiva, debido probablemente a la fuerte expresión en un corto tiempo el cual no permite el correcto plegamiento de la PMCA.

315. (7938) IDENTIFICACIÓN DE CANALES TRANSPORTADORES DE AGUA EN LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS. TYMCZYSZYN, EMMA; DAMIANO, ALICIA; TAUROZZI, MELINA; DISALVO, ANIBAL

Laboratorio de Físicoquímica de Membranas Lipídicas. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.

Laboratorio de Físicoquímica de Membranas Lipídicas. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Se ha estudiado el cultivo de *Lactobacillus bulgaricus* en medio de alta osmolaridad con el objetivo de pretratar a las células para que sean más resistentes al stress hídrico. Como resultado de estos estudios se ha encontrado, que en el crecimiento a bajas actividades de agua, las bacterias presentan una menor permeabilidad de membrana que las bacterias crecidas en medio base. Una de estas adaptaciones podría involucrar la presencia de canales transportadores de agua, como las acuaporinas. Estas pertenecen a una familia de proteínas intrínsecas de membrana que funcionan como canales de agua. Presentan una región altamente conservada flanqueada por la secuencia consenso, asparagina-prolina-alanina (NPA). Con estas evidencias se estudió la permeabilidad a través de cambios de volumen frente a un shock osmótico, en presencia y ausencia de un inhibidor (HgCl₂) a 3 y 0.3 mM. Estas concentraciones no produjeron alteraciones sobre la viabilidad o el potencial superficial de las bacterias. El estudio de la permeabilidad en presencia de estas concentraciones de mercurio demostraron una inhibición progresiva en el transporte de agua en función del tiempo de incubación con el inhibidor. Por técnicas de RT-PCR utilizando primers que flanquean la zona NPA-NPA conservada en todas las AQP's observamos una banda de aproximadamente 500 bp. Los estudios de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti AQP1 (AQP que presenta una elevada homología con las APQs de bacterias descritas hasta el presente) mostró una única banda de 22 kDa. Estos resultados sugieren que el movimiento de agua en bacterias lácticas podría deberse a la presencia de una AQP con elevada homología a la AQP1. Los resultados hallados a nivel funcional concuerdan hasta el momento con los encontrados a nivel molecular. Se realizarán estudios de clonado y secuenciación de la proteína de 22 KDA para determinar si corresponde o no a una AQP.

316. (8035) RELACIÓN ENTRE LA REGULACIÓN METABÓLICA Y LA REGULACIÓN IÓNICA INTRACELULAR DEL INTERCAMBIADOR NA+/CA2+ CARDIACO. POSADA, VELIA LUCY; BERBERIAN, GRACIELA

IMMF-INIMEC-CONICET

En axón de calamar dializado el intercambio Na+/Ca²⁺ es inhibido por H⁺ y por Na⁺, lo que es antagonizado por Ca²⁺ actuando en el sitio regulador intracelular (DiPolo, R and L. Beaugé, J. *Physiol.*, 539, 791- 803, 2002). En el sistema cardíaco y en el de nervio de calamar, se acepta una acción sinérgica entre Na⁺ y H⁺ y que ATP antagoniza la inhibición por Na⁺. Para analizar el mecanismo por el que ATP actúa, se midió en vesículas de sarcolema cardíaco, el intercambio Na+/Ca²⁺ mediante la captación de ⁴⁵Ca²⁺ dependiente del gradiente de Na⁺, en las siguientes condiciones: (i) [Ca²⁺]_i entre 1 y 100 uM; (ii) pH 6,8; 7,4

y 8,8; (iii) con y sin Mg.ATP. Resultados previos demuestran que MgATP activa el intercambio aumentando la afinidad por $(Ca^{2+})_i$ a través del incremento del PtdIns4,5-P2 unido al NCX1 (Asteggiano, C. y col. Eur. J. Biochem. 268, 437-442, 2001). Por ello, se cuantificó en paralelo el PtdIns4,5-P2 unido al NCX1 por densitometría relativa de «Western blot» con anticuerpos específicos contra ambas moléculas. Los resultados observados fueron: (i) la Km aparente para $(Ca^{2+})_i$ se incrementó de $1,33 \pm 0,04$ a $55,8 \pm 13$ (sin ATP) y de $0,24 \pm 0,01$ a $10,5 \pm 3,6$ (1 mM ATP) acidificando el pH de 7,4 a 6,8. (ii) la alcalinización de pH 7,4 a 8,8 incrementó la afinidad por $(Ca^{2+})_i$ a valores como los observados a pH 7,4 con ATP. A pH 7,8 y $[Ca^{2+}]_i$ no saturante (2 μ M), 1 mM ATP no incrementó el intercambio ni el PtdIns4,5-P2 unido al NCX1, el que fue de igual magnitud al observado a pH 7,4 en esas condiciones. Este valor fue alrededor del 100% mayor del control estimado a 2 μ M Ca^{2+} , pH 7,4 y ausencia de ATP. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que en el intercambiador Na^+/Ca^{2+} cardiaco el incremento en la afinidad del Ca^{2+} citosólico producido por aumento del pH intracelular estaría mediado por un incremento del PtdIns4,5-P2 unido al NCX1. Apoyado por FONCYT (PICT 05-12397) y Agencia Córdoba Ciencia (181/01).

ENDOCRINOLOGÍA 1

317. (6801) CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL DNA CODIFICANTE PARA LAS TRES FORMAS DE GnRH PRESENTES EN EL PEJERREY, ODONTES THES BONARIENSIS. GUILGUR, GASTON; STROBL-MAZZULLA, PABLO; FERNANDINO, JUAN; MIRANDA, LEANDRO; SOMOZA, GUSTAVO

Laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura. (IIB-INTECH)

La Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) es un péptido clave en la reproducción de vertebrados. Originalmente se consideraba que una sola forma molecular era producida por el Sistema Nervioso Central aunque hoy se sabe que la mayoría de las especies de vertebrados poseen dos o tres formas de GnRH con distribución diferencial en el cerebro. Sin embargo, poco se sabe acerca de la función de aquellas formas no relacionadas con el control de la actividad hipofisaria. En el pejerrey se han identificado por secuenciación tres formas moleculares de GnRH: chicken-II GnRH (cGnRH-II), pejerrey GnRH (pjGnRH) y salmón GnRH (sGnRH). El objetivo de este trabajo fue aislar, clonar y secuenciar el DNA codificante (cDNA) para los tres precursores de GnRH mediante 5' y 3'RACE. Con las secuencias obtenidas se diseñaron primers específicos para analizar los niveles de expresión de cada neuropéptido en diferentes áreas del cerebro de animales machos y hembras sexualmente maduros. Debido a la presencia de GnRH en gonadas y a evidencias que demuestran la existencia de receptores para GnRH en distintos tejidos, en otros peces teleosteos; se estableció el patrón de expresión de estas tres formas en tejidos extra-cerebrales como: ojo, riñón, bazo, branquia, hígado, hipófisis y gónada. Se caracterizó la secuencia completa de los marcos de lectura abiertos de las tres variantes: sGnRH (276), cGnRH-II (256) y pjGnRH (297). Se observó que los distintos GnRHs muestran mayor expresión en cerebro de machos que en hembras, lo que estaría evidenciando una posible acción dimórfica de estas hormonas. Son necesarios ensayos durante todo el ciclo reproductivo. Las tres variantes se expresan en distintos tejidos sugiriendo que GnRH cumple diversas funciones. Estos datos representan los primeros estudios para dilucidar la acción de GnRH durante los procesos de determinación/diferenciación sexual y ciclo reproductivo en el pejerrey bonaerense.

318. (6875) DISTRIBUCION DE GLUCOPROTEINAS EN LA PARS TUBERALIS (PT) DE BOVINO Y RATA. ALZOLA, RICARDO; MAIARÚ, MARÍA EUGENIA; FELIPE, ANTONIO; SOLANA, HUGO; RODRÍGUEZ, JULIO

Dpto de Cs. Biológicas. Fac. Cs. Vet. UNICEN

La PT constituye una parte de la adenohipofisis de vertebrados de función desconocida. Se subdivide en dos regiones, una cefálica unida a la superficie ventral de la eminencia media, y una porción caudal que envuelve parcialmente la porción proximal del infundíbulo, cubriendo las superficies ventral y ventrolateral del tallo infundibular. En la PT se han descrito dos grupos celulares, uno formado por células presentes en otras regiones de la adenohipofisis (células tipo PD o tipo pars distalis) y otro denominado como células propias de la PT. Entre estas células, la bibliografía señala el predominio en la rata de células secretoras de TSH (Hormona estimulante de la tiroides), las cuales pertenecen al grupo de células secretoras de glucoproteínas PAS+ (técnica del ácido peryódico de Schiff). En el caso de los bovinos son escasos los datos disponibles con respecto a la presencia de células secretoras de TSH. El objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia de glucoproteínas en la PT de bovino y rata. Las muestras fueron fijadas en Bouin y procesadas por técnicas histológicas de rutina y para metacrilato. Cortes en parafina de 5 μ m y cortes semifinos en metacrilato de 2 μ m, fueron teñidos con hematoxilina-eosina y con PAS. Los resultados observados en el bovino muestran una abundante red de fibras reticulares envolviendo los folículos. En éstos no se observan células PAS+, pero sí un material PAS+ en su lumen. En la pars distalis de rata observamos células PAS+ distribuidas aleatoriamente, envueltas en una rica red de fibras PAS+. En la región de la PT no se observan células positivas, sino sólo fibras PAS+ en el límite entre PT y eminencia media. Los resultados observados sugerirían la ausencia de componentes intracelulares PAS+ en las células de la pars tuberalis de bovino y rata. Esto podría indicar en ambas especies la ausencia de células secretoras de TSH, señaladas por algunos autores como las células predominantes de la PT de rata.

319. (7068) LA SOBREEXPRESIÓN DE FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-ALFA (TNF) Y FASL INDUCE APOPTOSIS DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS. CANDOLFI, MARIANELA*; YU, JOHN#; LIU, GENTAO#; FERRARI, LUCIANA*; BARCIA, CARLOSA*; LIU, CHUNYAN*; PUNTEL, MARIANA*; PISERA, DANIEL*; CASTRO, MARIA GRACIELA*; SEILICOVICH, ADRIANA*

(*). Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ^ Gene Ther. Res. Inst.; # Maxine Dunitz Neurosurg. Inst., Cedars Sinai Medical Center, CA, USA.

Resultados de nuestro laboratorio indican que la activación de los sistemas TNF/TNFR y FasL/Fas inducen apoptosis de células adenohipofisarias. Defectos en la inducción de apoptosis han sido involucrados en la tumorigénesis. En el presente trabajo estudiamos el efecto proapoptótico de la sobreexpresión de TNF y FasL en cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas hembras y en las líneas celulares adenohipofisarias, GH3 y AtT20. Las células fueron infectadas con vectores adenovirales recombinantes no replicativos que codifican para β -Galactosidasa (Rad-hCMV- β -Gal), TNF (Rad-hCMV-TNF) o FasL (Rad-hCMV-FasL) bajo el control del promotor del citomegalovirus humano (hCMV). La expresión de β -Galactosidasa, TNF y FasL en las células infectadas fue detectada por ICQ. El análisis del ciclo celular (FACS) reveló un aumento en el porcentaje de hipodiploidía en células adenohipofisarias infectadas con Rad-hCMV-TNF o Rad-hCMV-FasL (C: $5\% \pm 3,1$; TNF: $33,7\% \pm 8$; FasL: $34,2\% \pm 4,4$, $p < 0,01$). Resultados similares fueron observados en las líneas celulares GH3 (C: $1,7\% \pm 0,9$; TNF: $41,3\% \pm 2,6$; FasL: $47,2\% \pm 5,5$, $p < 0,01$) y AtT20 (C: $3,1\% \pm 0,6$; TNF: $71,6\% \pm 5,8$; FasL: $33,1\% \pm 4,6$, $p < 0,01$). La sobreexpresión de β -Galactosidasa no afectó los porcentajes de hipodiploidía en ninguno de los sistemas estudiados. El análisis microscópico de la morfología nuclear por tinción con DAPI y TUNEL sugiere que la muerte celular inducida por la sobreexpresión de estas citoquinas es debida a la inducción de apoptosis. En conclusión, estos datos sugieren que los sistemas TNF/TNFR y FasL/Fas son funcionales tanto en células adenohipofisarias normales como

tumorales y podrían participar en los procesos de muerte celular. La sobreexpresión de TNF y FasL podría contribuir al tratamiento de los tumores adenohipofisarios. Este trabajo fue realizado con subsidios de ANPCYT 10598 y FIRCA 1RO3 # TW006273-01.

320. (7207) EVALUACIÓN ENDOCRINA DE RATONES CARENTES DEL RECEPTOR GABA(B1). CATALANO, PAOLO (1,2); BONAVENTURA, MARÍA (1); SILVEYRA, PATRICIA (1); BETTLER, BERNHARD (3); LIBERTUN, CARLOS (1,2); LUX-LANTOS, VICTORIA (1)

IBYME-CONICET, V. de Obligado 2490 (1428), Bs. As. (1); Univ. de Buenos Aires (2) Univ. de Basilea, Suiza (3)

GABA participa en la regulación endocrina actuando a través de sus receptores A, B ó C. Previamente describimos farmacológicamente la participación de los RGABA(B) en la regulación hormonal durante el estrés y la lactancia. Recientemente se generaron ratones BALB/C sin expresión de la subunidad RGABA(B1) (KO) (Bettler y col., *Neuron*. 2001; 31:47-58), los que desarrollaron un cuadro neurológico característico. Aquí evaluamos el estado endocrino de los ratones KO en estado basal y durante la activación de distintos ejes. PRL y LH séricas, y estradiol (E2), testosterona (T) y progesterona (P) testiculares, fueron medidas por RIA. Se observó un comportamiento Mendeliano en la distribución genotípica. No se observaron diferencias en el peso en la adultez de machos y hembras KO y salvajes (S); tampoco diferencias en la apertura vaginal entre los genotipos. En ratones hembras LH basal fue semejante entre KO y S, y la castración (7 días) la aumentó significativamente en ambos grupos. La administración de un pellet de 17 β E2 (2.5 μ g, sc) no inhibió LH en los KO [LH (ng/ml): S-basal: 0.35 \pm 0.08, S-castr: 4.62 \pm 0.71, S-castr-E2: 0.55 \pm 0.10, KO-basal: 0.28 \pm 0.05, KO-castr: 9.17 \pm 3.60, KO-castr-E2: 4.84 \pm 3.00; ANOVA en dos sentidos: interacción: p<0.07]. Machos KO y S respondieron al estrés por inmovilización (15 min) con un aumento de PRL (p<0.002). En su conjunto, los KO mostraron niveles más altos de PRL que los S (p<0.03). [PRL (ng/ml): S-control: 2.54 \pm 0.39, S-estrés: 11.34 \pm 2.6, KO-control: 8.56 \pm 3.90, KO-estrés: 22.71 \pm 9.67]. Los pesos testiculares y la concentración tisular de T, E2 y P fueron semejantes entre los KO y S. Conclusión. Estas son las primeras evidencias de alteraciones hormonales en ratones RGABA(B1) KO: se hallaron alteradas la respuesta al 17 β E2 de la LH postcastración en hembras y de PRL sérica en machos. (UBA-CONICET-ANPCyT).

321. (7240) EFECTOS DE LA PROGESTERONA (PROG) SOBRE PARÁMETROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN RATAS CON TRANSECCIÓN COMPLETA DE LA MÉDULA ESPINAL (SCI). MOUGEL, ANALÍA V.; GONZÁLEZ, SUSANA L.; YORIO, ALBERTO (1); DE NICOLA, ALEJANDRO F.

Laboratorio de Bioquímica Neuroendócrina, IBYME; Facultad de Medicina, UBA. (1) Laboratorio de Biología del Comportamiento, IBYME

La hiperreflexia es característica de las lesiones espinales crónicas y responsable de espasticidad. En estudios previos demostramos que PROG posee efectos protectores en un modelo de SCI, modulando la expresión de proteínas neuronales/gliales y estimulando la mielinización. En este trabajo se estudió el efecto de PROG sobre el reflejo H, parámetro útil para monitorear la adaptación funcional de las vías reflejas en animales con o sin injuria espinal. Se evaluaron ratas macho con SCI a nivel torácico, con vehículo o PROG (4mg/kg peso/día, x 7 días) a los 7 días, 20 días y 40 días post-lesión y animales control (CTL) con o sin tratamiento. Se registró el potencial compuesto de acción muscular M y la onda tardía H en un osciloscopio (Akonic 4001) por estimulación del nervio tibial posterior y registro con electrodo de aguja coaxial insertado en el músculo flexor digitorum. La amplitud (μ volts) de la onda H a 1Hz, 4Hz y 8 Hz se expresó como porcentaje de la respuesta máxima. En CTL y CTL+PROG la onda H se atenuó por activación repetitiva a mayores frecuencias. A los 40 días post-

injuria, el grupo SCI mostró resistencia a la depresión refleja H tanto a 4 Hz (SCI: 78.3 \pm 11.5%, CTL: 30.0 \pm 6.7%, P<0.001) como a 8 Hz (SCI: 53.0 \pm 6.6, CTL: 10.0 \pm 2.4, P<0.001). PROG contribuyó a la atenuación del reflejo H, normalizándolo con respecto al grupo SCI (A 4 Hz: SCI+PROG: 35.0 \pm 3.2, y a 8Hz: SCI+PROG: 22 \pm 2.1, P<0.001 vs.SCI), sin mostrar cambios en la latencia. El grupo SCI+PROG presentó un puntaje de locomoción (escala 21 puntos-BBB) de 14.3 \pm 0.7, superior al grupo sin tratar (SCI: 8.6 \pm 1.7, P<0.01). Se sugiere que PROG, modulando la inhibición presináptica o por efectos directos sobre motoneuronas espinales, participa en el reestablecimiento de la inhibición refleja luego de la injuria. Este efecto representaría una estrategia de relevancia clínica para paliar la hiperreflexia, aún en ausencia de recuperación funcional total.

322. (7246) EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS DE GnRH EN CÉLULAS LÚTEAS CONTROLES Y TUMORALES: MECANISMOS DE ACCIÓN Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN. FERNÁNDEZ, MARINA (1,2); MONGIAT, LUCAS (1); LUX-LANTOS, VICTORIA (1); LIBERTUN, CARLOS (1,2)

IBYME-CONICET (1), Univ. de Buenos Aires (2)

Previamente demostramos que células lúteas tumorales secretan mayor cantidad de GnRH, y además que éste ejerce un efecto antiproliferativo en células lúteas controles y tumorales. Aquí investigamos las vías de señalización por las cuales un agonista de GnRH (Buserelina; Bus) ejerce su efecto antiproliferativo y si en éste está involucrado un componente pro-apoptótico. Obtuvimos células de tumores ováricos intraesplénicos de 6-8 semanas de desarrollo (T) y de ovarios de hembras prepúberes superovuladas con PMSG-hCG (SPO) y las cultivamos en presencia o ausencia de distintos estímulos. La apoptosis fue medida por ELISA como con un kit comercial (Roche) y la proliferación en presencia de inhibidores de las vías de señalización (SQ22536, de adenilil ciclasa; U73122, de fosfolipasa C; toxina Pertussis, de proteína Gi) usando un kit comercial (MTS, Promega). No se observaron diferencias en la apoptosis basal en T a ninguno de los tiempos ensayados de 6, 24 y 48 hs. En SPO hubo un aumento a las 6 hs (Apoptosis: SPO-0hs: 0.42 \pm 0.07 vs SPO-6hs: 0.99 \pm 0.05, p<0.05). La apoptosis basal a las 0, 6 y 24 hs es mayor en SPO que en T (p<0.01). Además, Bus aumentó la apoptosis respecto del control a las 24 hs de cultivo en T (Apoptosis: T-Basal24: 0.26 \pm 0.02 vs T-Bus24: 0.36 \pm 0.03, p<0.05), pero no en SPO (Apoptosis: SPO-Basal24: 0.64 \pm 0.03 vs SPO-Bus24 0.69 \pm 0.07). Mediante los inhibidores específicos de las vías de señalización observamos que Bus utilizaría la vía de la fosfolipasa C en SPO (p<0.05), y las de la adenilil ciclasa (p<0.05) y la proteína Gi (p<0.01) en T. Conclusiones: GnRH estaría ejerciendo un efecto pro-apoptótico en células T y no en SPO, las que tienen un mayor índice de apoptosis basal. Además, los efectos antiproliferativos en ambos tipos celulares se ejercerían por diferentes vías de señalización. (CONICET, UBA, ANPCYT, Ministerio de Salud).

323. (7247) PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) EN LA HIPERPLASIA HIPOFISARIA DE RATONES HEMBRA KNOCKOUT PARA EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO TIPO2 (D2). CRISTINA, CAROLINA(1); DÍAZ-TORGA, GRACIELA(1); GÓNGORA, ADRIÁN(1); BALDI, ALBERTO(1); RUBINSTEIN, MARCELO(2); BECÚ-VILLALOBOS, DAMASIA(1)

(1) IBYME-CONICET; (2) INGEBI-CONICET

Los ratones hembra knockout para el receptor dopaminérgico D2 (ko) desarrollan hiperprolactinemia crónica e hiperplasia hipofisaria de lactotropos. Dado que todos los tumores requieren una adecuada vascularización para su desarrollo, nos propusimos investigar la participación del VEGF, potente regulador de la permeabilidad vascular y la angiogénesis, en nuestro modelo experimental. Determinamos el contenido de VEGF en

adenohipofisis de ratones hembra de 8-10 meses ko y wildtype (wt) por Western Blot y RT-PCR semicuantitativa y encontramos un aumento significativo de VEGF en los animales ko respecto a sus pares wt tanto a nivel de proteína (ko:234 ± 20% vs wt:100.0 ± 8%, P=0.0036) como de RNA (ko:2.81 ± 0.21 vs wt:2.08 ± 0.05, P=0.043). Un tratamiento crónico con el antagonista dopaminérgico haloperidol (HAL) en hembras wt provocó un aumento de los niveles de VEGF respecto a los controles(C) (HAL:225.3 ± 28.1% vs C:100.0 ± 14.4%, P=0.0029), como también en la PRL sérica. Por el contrario el tratamiento crónico con el agonista dopaminérgico cabergolina (CG) no disminuyó de manera significativa los niveles de VEGF hipofisarios a pesar de haber producido la disminución esperada en la PRL sérica. Asimismo, en células adenohipofisarias en cultivo encontramos un incremento de VEGF en ko (ko:188.2 ± 26% vs wt:100 ± 6.9%), y una mayor liberación de PRL al medio (ko:6570 ± 449 vs. wt: 4905 ± 357 ng/ml, P=0.0099) a pesar de que las células provenientes de los ko proliferaron menos que las células wt, como pudimos determinar por ensayos de proliferación. Concluimos que el aumento de VEGF en la hipófisis de los ratones ko podría estar actuando sobre las células endoteliales intrahipofisarias, promoviendo la angiogénesis necesaria para el desarrollo tumoral, pero que no sería el responsable directo de la proliferación de los lactotrofos.

324. (7359) EL ÓXIDO NÍTRICO REDUCE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y PREVIENE LA DISRUPCIÓN DEL POTENCIAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INDUCIDOS POR CADMIO EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS. POLIANDRI, ARIEL; MACHIAVELLI, LETICIA; QUINTEROS, FERNANDA; DUVILANSKI, BEATRIZ

Departamento de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Previamente demostramos que el Cd aumenta la síntesis de NO e induce apoptosis en células adenohipofisarias en cultivo. La inhibición de la síntesis de NO aumenta la sensibilidad al metal mientras que el NO exógeno protege a las células del Cd. Nuestros objetivos fueron determinar las vías por las cuales el Cd dispara la apoptosis y el punto en el que podría intervenir el NO. El Cd 25 µM produce un aumento rápido y transitorio de las especies reactivas del oxígeno (ROS) medido por citometría de flujo (% del control, 0.5 h: 106.9 ± 0.2, 1 h: 135.0 ± 0.2*, 3 h: 117.1 ± 0.2*, 6 h: 78.3 ± 0.1*, 18 h: 76.6 ± 0.1*, n=10000, * p<0.001 vs. control). El DETA 0.1 mM, dador de NO, reduce el pico de producción de ROS (1 h, % del control, Cd: 158.9 ± 0.3*, DETA: 117.7 ± 0.2*, Cd + DETA: 104.3 ± 0.2^, n=10000, * p<0.001 vs. control, ^ p<0.001 vs. Cd). El Cd 25 µM tiene un efecto bifásico sobre el potencial de la membrana mitocondrial (PMM) (citometría de flujo, % del control, 1 h: 438.3 ± 1.2*, 3 h: 92.8 ± 0.3*, 6 h: 86.6 ± 0.2*, 12 h: 53.8 ± 0.2*, 18 h: 40.6 ± 0.1*, n=10000, * p<0.001 vs. control). El DETA 0.1 mM evita la caída del PMM inducida por Cd (18 h, % del control, Cd: 40.6 ± 0.1*, DETA: 93.7 ± 0.25*, Cd + DETA: 67.2 ± 0.2* ^, n=10000, * p<0.001 vs. control, ^ p<0.001 vs. Cd). El calcio intracelular ([Ca²⁺]) aumentó en las células tratadas con Cd (1 h, % del control: 155.9 ± 0.4*, n=6000, * p<0.001 vs. control). Estos resultados sugieren que la producción de ROS es un evento temprano en la citotoxicidad del Cd. Este aumento puede deberse a un incremento de la velocidad de la cadena de transporte de electrones ya que coincide temporalmente con el aumento del PMM. El aumento del [Ca²⁺] también podría dañar a la mitocondria y generar ROS. El NO protegería a la membrana mitocondrial reduciendo el daño oxidativo ya sea por la inhibición de la producción de ROS (inhibición de la cadena de electrones) o actuando como un antioxidante per se.

325. (7575) EFECTO DE GHRH Y SOMATOSTATINA EN CULTIVO DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS DE RATONES WILDTYPE Y KNOCKOUT PARA EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2. GARCÍA TORNADÚ, ISABEL ANDREA; ORNSTEIN, ANA MARÍA ; DÍAZ-TORGA, GRACIELA; BECÚ-VILLALOBOS, DAMASIA

IBYME-CONICET

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que los ratones deficientes del receptor dopaminérgico tipo 2 (D2) (KO) poseen menor peso y tamaño corporal respecto a sus pares wildtype (WT) (Endocrinology 143:1270:2002). Estos ratones presentan alterado el eje de crecimiento hipotálamo-hipofisario con menores niveles de GH e IGF-1 circulantes a edades tempranas, que normalizan a edad adulta. Sin embargo la secreción basal de GH en cultivo primario de células adenohipofisarias continúa alterada en animales adultos siendo menor en los ratones KO. En el presente trabajo evaluamos la respuesta hipofisaria «in vitro» de GH a los principales moduladores de su secreción: GHRH y Somatostatina. GHRH produjo una menor estimulación en células provenientes de animales KO de 8 meses de edad respecto a las de sus pares WT. Al evaluar mediante la técnica de Western Blot la expresión hipofisaria del receptor de GHRH encontramos que está significativamente disminuida en los animales KO (P=0.0158). En correlación, la producción de AMPc intracelular luego de una estimulación con GHRH (10⁻⁷ a 10⁻⁹ M) resultó menor en los animales KO (P=0.0031 para la concentración de 10⁻⁸ M). Por otro lado, no encontramos diferencias entre genotipos en la respuesta inhibitoria a Somatostatina (10⁻⁷ a 10⁻⁹ M) tanto de GH como de PRL (P de Interacción = 0.84 y 0.33 para GH y PRL respectivamente). Concluimos que, a pesar de poseer niveles séricos de GH similares a los de WT, los machos adultos KO tienen una respuesta menor de GH a GHRH, la cual estaría dada por una disminución en la expresión del receptor de GHRH y la consecuente menor activación de la adenil ciclasa. Asimismo, el sistema inhibitorio de somatostatina no estaría alterado. Estos resultados resaltan la participación del RD2 en el desarrollo normal del eje de crecimiento.

326. (7616) LA ACTIVACION DE FAS INDUCE APOPTOSIS DE CELULAS ADENOHIPOFISARIAS. JAITA, GABRIELA ALEJANDRA; CANDOLFI, MARIANELA; ZARATE, SANDRA; ZALDIVAR, VERONICA; PISERA, DANIEL; SEILICOVICH, ADRIANA

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

Nuestros resultados previos demostraron que el sistema Fas/FasL se expresa en células adenohipofisarias y que dicha expresión es estimulada por los estrógenos. En el presente trabajo, en el que evaluamos la expresión del sistema Fas/FasL en cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas hembras sacrificadas en proestro o diestro, observamos que tanto la expresión de Fas como de FasL es mayor en proestro que en diestro (Fas P: 34% Fas D: 22%, p<0.001 chi2; FasL P: 56%, FasL D: 48% p<0.001). Dado que la activación de Fas induce apoptosis, estudiamos su efecto utilizando un anticuerpo monoclonal anti-Fas (A-Fas, 1µg/ml). La activación de Fas indujo apoptosis (TUNEL) en células adenohipofisarias provenientes de ratas en proestro (C: 13%; A-Fas: 19 %, p<0.001, chi2), pero no en diestro (C: 7%; A-Fas: 7%). En células adenohipofisarias provenientes de ratas ovariectomizadas incubadas en presencia de 17β-estradiol, la activación de Fas utilizando un ligando recombinante (FasL), incrementó el porcentaje de células con hipodiploidía (FACS) de manera dosis dependiente (C: 2.9% ± 1.6; FasL 5 ng/ml: 9.9 ± 0.2, ns; FasL 10 ng/ml 23.4 ± 1.3, p<0.01; FasL 20 ng/ml: 21.7 ± 3.4, p<0.01). FasL también aumentó el porcentaje de lactotrofos con hipodiploidía (C: 14.4 ± 3.2; FasL 5 ng/ml: 16.0 ± 0.2, ns; FasL 10 ng/ml 37.6 ± 2.2, p<0.01; FasL 20 ng/ml: 33.6 ± 4.7, p<0.01). Además, en presencia de 17β-estradiol, FasL aumentó el porcentaje de lactotrofos TUNEL positivos (C:17%; FasL 10 ng/ml: 27%, p<0.05, chi2). La incubación con FasL aumentó 4 veces la actividad de caspasa 3 en presencia de 17β-estradiol (C: 0.06 DO/mg de proteínas ± 0.02; FasL 10 ng/ml: 0.30 ± 0.02, p<0.001). En conclusión, estos datos sugieren que la activación de Fas induce activación de caspasa 3 y apoptosis de células adenohipofisarias. El sistema Fas/FasL podría participar en los procesos de muerte celular involuclados en la renovación celular de la población de lactotrofos durante el ciclo estral.

327. (7840) RESPUESTA DE LA POBLACIÓN CORTICOTROPA ADENOHIPOFISARIA A LA INMUNONEUTRALIZACIÓN DE LA TIMULINA SÉRICA DURANTE LA VIDA TEMPRANA DE RATONES MACHOS Y HEMBRAS. LUNA, GEORGINA^{1,2}; CAMIHORT, GISELA¹; FERESE, CELIA²; GOYA, RODOLFO³; CONSOLE, GLORIA^{1,2}

Cátedra 'B' de Histología-Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP¹, CICBA², INIBIOLP³

Estudios previos en ratones nude y en lauchas timectomizadas mostraron que la ausencia de timo durante la vida perinatal causa múltiples desórdenes neuroendocrinos. La inmunoneutralización de la timulina sérica pretende explorar la hipótesis de que la timulina participan en dichos cambios. Se investigaron los parámetros morfológicos en la población corticotropa. Ratones hembras y machos C57BL/6 fueron inyectados con suero normal de conejo (SNC) o con antisuero anti-timulina (AAT) (12µl/g, vía i.p.) en los días 2, 3, 7, 14, 21 y 29 de vida postnatal. A los 33 días fueron sacrificados, obteniéndose pituitarias que fueron procesadas para microscopía de luz y muestras séricas para la determinación de timulina mediante RIA, 10 días: pre-tratamiento 288 ± 81; post-tratamiento 24 ± 20 fg/ml y bioensayo de rosetas. Se inmunomarcó con un sistema anti-ACTH-EnVision (Dako)-DAB. Se registraron los parámetros morfológicos mediante videomicroscopía (Optimas), densidad de volumen (DV), densidad de células (DC) y tamaño celular (TC). Se hallaron cambios significativos en DC (p= 0.003) y TC (p=0.0004) en machos tratados (AAT) respecto a controles.

	Hembras SNC	Hembras AAT	Machos SNC	Machos AAT
DV (x10 ⁻²)	8.2 ± 1.5	7.5 ± 0.8	7.1 ± 0.8	5.5 ± 0.6
DC (x10 ⁻⁴)	8.7 ± 1.5	10.7 ± 0.5	12.5 ± 1.3	4.8 ± 0.1 *
TC (µm ²)	92.2 ± 7	67.5 ± 6	60.3 ± 2	115.1 ± 12 *

Se han detectado alteraciones en la población corticotropa de machos, con hipoplasia e hipertrofia celular compensadora. Se sugiere que las hormonas pituitarias pueden enviar señales positivas y negativas, regulando la proliferación de timocitos.

328. (7858) EL GANGLIO MESENTÉRICO SUPERIOR (GMS) MODIFICA LA LIBERACIÓN DE OXIDO NÍTRICO (ON) EN ESTRO. VEGA, ADRIANA; DELGADO, SILVIA; CASAIS, MARILINA; SOSA, ZULEMA; RASTRILLA, ANA

Laboratorio Biología de la Reproducción

El GMS, integrante de la cadena prevertebral simpática alcanza el ovario (O) a través del plexo nervioso ovárico(PNO), ingresa por el hilio e inerva fundamentalmente los vasos sanguíneos y células de la teca. Los objetivos fueron: a) estandarizar un sistema integrado GMS-PNO-O en estro(E), etapa del ciclo estral donde existe en el ovario un marcado aumento de la irrigación y profundos cambios estructurales. b) si el estímulo neural desde el GMS modifica la liberación de un neurotransmisor gaseoso que presenta gran influencia en la irrigación de sus órganos blanco como es el ON. Para ello se trabajo en los sistemas derecho e izquierdo aislados in vitro. Se adicionó en el compartimiento ganglionar CIK como estimulante inespecífico y Acetilcolina (10-6M) como agente colinérgico. Se determinó en el líquido de incubación ovárico la secreción de Progesterona (P) por RIA para la estandarización de los tiempos de incubación y estimulación inespecífica (expresada como pg/mg ovario ± SEM) y para la estimulación colinérgica ganglionar se determinó nitritos (metabolito soluble del ON) por el método de Griess (nmoles/mg ovario ± SEM). Los tiempos de incubación fijados fueron a los 15, 30, 60, 120 min. Se aplicó test de Student con una significancia de p <0.05. Los valores controles de P Der: 15min: 29.5±10; 30: 38± 10; 60: 39± 11; 120: 43.5± 1; Izq. 15min: 40.5±10; 30: 55.5± 1; 60: 78± 0.7 y 120: 77± 2. Nitritos: Der:

15min: 31±1.5; 30: 42± 2.5; 60: 48.2± 3.1; 120: 36.5± 1.8; Izq. 15: 28.5±1.5; 30: 35.7± 2.5; 60: 45.6± 1.7 y 120: 36.7± 2.5. La adición de CIK al compartimiento ganglionar estimuló la liberación de P en ovario derecho(p<0.05) e inhibió en el izquierdo(p<0.001). Ach en ganglio estimuló la liberación de nitritos pero mas significativamente en el izquierdo (p<0.001) con respecto a sus controles. Conclusión: El GMS influye sobre la fisiología ovárica. Se observa mayor sensibilidad del ovario izquierdo al estímulo neural, al menos para la liberación de nitritos en esta etapa del ciclo estral.

ENDOCRINOLOGÍA 2

329. (6834) MODULACIÓN DIFERENCIAL POR PROGESTERONA DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN PROESTRO Y ESTRO. COMPARACIÓN ENTRE RATAS WISTAR, SPRAGUE DAWLEY Y OFA HR/HR (HIPOPROLACTINÉMICA). VALDEZ, SUSANA R.; DEIS, RICARDO P; JAHN, GRACIELA A

IMBECU-CRICYT-CONICET, LARLAC-IMBECU-CRICYT-MENDOZA

La progesterona (Pg) regula la respuesta de PRL al estrés. La Pg liberada después de un 1º estrés (1ºS) frena la secreción de PRL inducida por un 2º estrés (2ºS) aplicado 30 pero no 60 min después. La cepa hipoprolactinémica OFA hr/hr (OFA) tiene respuestas alteradas al estrés (S) y parece ser menos sensible a la Pg. Comparamos las respuestas al 2ºS en ratas OFA, Wistar (Wi) y Sprague Dawley (SD) en proestro (P) y estro (E) para evaluar el impacto del ambiente hormonal sobre la sensibilidad al S. Las ratas se estresaron con éter por 2 min a las 12 h (1ºS) del P o del E, el 2ºS se aplicó 30 o 60 min después. Se sangraron 5 min luego del 1ºS o 2ºS. Se midió PRL y Pg sérica por RIA. En P el 1ºS bloqueó la respuesta de PRL en Wi y SD a los 30 min, recuperándose a los 60 min y en OFA el 1ºS no afectó la respuesta al 2ºS. En E la respuesta al 1ºS fue mayor en SD y OFA que en Wi quizás por mayor sensibilidad al E2 preovulatorio. A los 30 min la respuesta de PRL se bloqueó en las 3 cepas, mientras que a los 60 min Wi y SD recuperaron la respuesta y en OFA siguió inhibida. No hubo diferencias en la respuesta de Pg al 2ºS en P y E ni entre cepas. TABLA: % de aumento en PRL * p<0.05 vs. basal (basal = 100%); # p<0.05 vs 1ºS. PRL Basal P: 7-12 ng/ml para las 3 cepas; E Wi: 13, SD y OFA 20-24 ng/ml

	Proestro 1ºS	2ºS 30'	2ºS 60'	Estro 1ºS	2ºS 30'	2ºS 60'
Wi	346*	142#	218*	327*	124#	253*
SD	389*	98#	197*	938*	280#*	1019*
OFA	867*	511*	273*	744*	174#	312#*

Como observamos previamente, en las ratas OFA, Pg en P fue menos capaz de inhibir la respuesta al estrés comparada con Wi o SD, mientras que en E, Pg fue capaz de frenar la respuesta al 2ºS, posiblemente a través de un efecto permisivo del E2 segregado en P.

330. (6868) RESPUESTA AL NITROPRUSIATO DE SODIO DISMINUIDA EN ANILLOS AÓRTICOS SIN ENDOTELIO OBTENIDOS DE RATAS CON PANCREATECTOMÍA SUBTOTAL. REYES TOSO, CARLOS FELIPE; LINARES, LAURA MERCEDES; ALBORNOZ, LILIANA ESTHER; OBAYA NAREDO, DANIEL L; RODRIGUEZ, RICARDO ROSENDO; CARDINALI, DANIEL PEDRO

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA. Paraguay 2155 Piso 7. Buenos Aires. Argentina

En estudios previos demostramos que los anillos aórticos de ratas con pancreatectomía subtotal (Ppx) presentan una menor relajación a la acetilcolina (Ach), con contracción normal a la

fenilefrina (Phe). Este efecto se potencia con la pre-incubación de los anillos en una solución con 44mM/l de glucosa -GA- (glucosa alta). El agregado de melatonina (Mel) al medio revierte este efecto. A partir de estos resultados se decidió estudiar los mecanismos implicados en la respuesta observada. Luego de destruir el endotelio, se colocaron anillos extraídos de aorta torácica en un baño para tejidos. Después de un período de estabilización se registró la tensión isométrica desarrollada al agregar CIK y se efectuaron curvas acumulativas dosis-respuesta a la Phe en anillos de ratas No Ppx y Ppx que no presentaron diferencias significativas. A continuación se obtuvo una curva concentración-dependiente al nitroprusiato de sodio (NPS) -dador de óxido nítrico NO- entre -10(10)-10(5)M-. En este último caso, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la relajación de los anillos obtenidos de ratas No Ppx y Ppx incubadas en un medio con glucosa normal (GN). Sin embargo, los anillos de ratas Ppx en GA relajaron menos que los Ppx en GN (NPS -10(8)-10(7)M, $p < 0.001$). El agregado de Mel (10-5 M/l) revirtió dicho efecto ($p < 0.05$). Los anillos de ratas con Ppx presentan una relajación Ach-dependiente disminuida, y privados del endotelio en un medio con GA poseen menor respuesta al NPS que los Ppx incubados con GN. Este fenómeno es revertido por el agregado de Mel. Teniendo presente que está descrito que la incubación de tejidos en un medio con GA eleva la producción de especies reactivas del oxígeno, es posible que la reversión observada en la respuesta al NPS en el grupo incubado con Mel sea debida en parte al efecto anti-oxidante de la hormona pineal.

331. (6940) PGF2ALFA EN EL TESTÍCULO DEL HÁMSTER DORADO: SÍNTESIS LOCAL, RECEPTORES DE PGF2ALFA (FP) Y SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS. FRUNGIERI, MONICA BEATRIZ; GONZALEZ-CALVAR, SILVIA; ALBRECHT, MARTIN; MAYERHOFER, ARTUR; CALANDRA, RICARDO

IBYME, CONICET; Medicina, UBA; LMU, Munich; Exactas, UNLP; IMBICE, La Plata

El rol de las prostaglandinas (PGs) en el testículo permanece sin ser esclarecido. En este trabajo se evaluó la presencia y regulación de la enzima ciclo-oxigenasa (COX, clave en la biosíntesis de PGs), la existencia de receptores de PGs, y la acción de las PGs sobre la esteroidogénesis en testículos de hámsteres Dorados adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN, 14h luz:10h osc) o transferidos a fotoperíodo corto (FC, 8h luz:16h osc) por 16 semanas a fin de alcanzar el máximo grado de regresión gonadal. Por RT-PCR e inmunohistoquímica se observó que, mientras COX1 (isoforma constitutiva) no se expresa en testículos de hámsteres, COX2 (isoforma inducible) se expresa en células de Leydig de hámsteres mantenidos en FN, pero está ausente en testículos regresionados. Estudios in vitro realizados con células de Leydig purificadas seguidos por RT-PCR demostraron que, la expresión de COX2 en testículos activos es inducida por hCG y testosterona (T). Por RT-PCR se estableció la presencia de los receptores de PGs: FP, DP, EP1/2/3 y PPARgamma en el testículo. Experimentos de producción in vitro de T en presencia o ausencia de hCG (100 mUI/ml) y/o de las PGs: PGD2, PGE2 y PGF2alfa indicaron que sólo PGF2alfa influencia el proceso esteroidogénico. Así, 1µM de PGF2alfa inhibe significativamente la producción de T en presencia de hCG [pmol/10(6) células de Leydig, hCG: 63.40±2.99; hCG + 1µM PGF2alfa: 42.83±1.81, $P < 0.05$]. Este efecto de PGF2alfa sobre la producción de T ocurre vía inhibición de la expresión de 17β-hidroxi esteroide deshidrogenasa (17βHSD). Además se estableció que el testículo del hámster adulto mantenido en FN contiene y secreta PGF2alfa. En resumen, en el testículo del hámster adulto activo, hCG y T inducen la expresión de COX2 y la subsiguiente producción de PGF2alfa. Así, PGF2alfa, vía receptores FP y modulación de la expresión de 17βHSD, participaría en el control local de la esteroidogénesis testicular.

332. (6962) ESTUDIO DE LA TESTOSTERONA EN SALIVA EN VARONES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA EN HEMODIÁLISIS. ARREGGER, ALEJANDRO; CONTRE/

RAS, LILIANA; PERSI, GABRIEL; GONZALEZ, NATALIA; MONTINI, SONIA (1); ZUCCHINI, ALFREDO(1); CARDOSO, ESTELA

Departamento de Endocrinología Experimental, IDIM A.Lanari, UBA-Conicet; Departamento de Nefrología, IDIM-A.Lanari, UBA

La insuficiencia renal crónica se asocia a alteraciones del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal. La determinación de testosterona en saliva (Tsal) ha sido propuesta para el estudio no invasivo del hipogonadismo. Basados en estos antecedentes investigamos la Tsal y la testosterona total plasmática (T) en 13 pacientes de sexo masculino (edades 30-50 años) con insuficiencia renal crónica (IRC) en hemodiálisis trisemanal que consultaron por disfunción eréctil. Se excluyeron pacientes tratados con drogas que afectarían la esteroidogénesis. Los controles fueron 40 individuos sanos normogonádicos (N) en el mismo rango etario. En todos los sujetos se obtuvieron en forma simultánea muestras de saliva entera y sangre a las 8 horas. En IRC y en N (n: 13) se obtuvieron muestras de saliva a las 7, 8, 9, 19, 20 y 23 horas para investigar la variación horaria de la hormona. En las muestras séricas y de saliva se determinó testosterona por RIA. La Tsal 8 hs se correlacionó significativamente con la T 8 hs en IRC ($r = 0,71; p = 0,008$) y en N ($r = 0,72; p = 0,001$). En N, la Tsal 8 hs (media ± DS) fue de 353,0 ± 170,0 pmol/L y la T 8 hs = 18,0 ± 7,1 nmol/L, siendo el valor mínimo de Tsal = 200,0 pmol/L y de T = 10,5 nmol/L. En 6 pacientes con IRC a las 8 hs tanto Tsal (84,0; 145,0; 104,0; 173,0; 166,0; 52,0 pmol/L) como T (8,3; 8,9; 3,4; 7,0; 8,3; 7,7 nmol/L) fueron menores al valor inferior definido en N. No hubo diferencias significativas en Tsal matutina (7vs8vs9 hs) ni vespertina (19vs20vs23 hs) en IRC ni en N ($p > 0,634$). La Tsal 8 hs en IRC (239,0 ± 177,0 pmol/L) y en N (384,0 ± 114,0 pmol/L) fue significativamente mayor ($p < 0,003$) a la Tsal 23 hs (146,0 ± 102,0 pmol/L y 179,0 ± 48,0 pmol/L, respectivamente). En la población estudiada las concentraciones de testosterona en saliva se correlacionaron con los niveles circulantes de testosterona total. En 6 pacientes con IRC se encontraron concentraciones disminuidas de testosterona sérica y salival.

333. (6966) ASPECTOS HISTOLOGICOS DEL DESARROLLO PREPUBERAL DEL TESTICULO Y EPIDIDIMO EN RATAS INYECTADAS CON ALOXANO EN EL POSDESTETE. VÁZQUEZ, SILVIA; HISANO, NORIYUKI

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas

Comunicamos el estudio histológico del testículo y epidídimo después de la inyección de una dosis única de aloxano en el posdestete. Ratas machos de la línea «m» se inyectaron con una dosis i.p. de aloxano (A) (24mg/100 g de peso corporal) a los 25.56 ± 0.56 días. Se determinó la glicemia. A ratas controles (C) se les inyectó agua destilada (10cc/100 g. peso corporal). Los animales se sacrificaron con sobredosis de éter a los 31, 46, 62, 75, 105 días de edad (4-5 animales por grupo etario). Se diseccionaron los testículos y epidídimos que se pesaron. El epidídimo derecho fue procesado y se determinó en una cámara de Neubauer la cantidad de espermatozoides/mg epidídimo. El epidídimo izquierdo y los testículos fueron procesados rutinariamente para el estudio histológico, coloreados con H-E, PAS+H. Los resultados se expresan en media ± SEM y fueron analizados estadísticamente. El peso corporal, testicular y epididimario son menores en los animales inyectados con aloxano a lo largo de todas las edades consideradas. P.ej. A los 75 días de edad: 1.-Peso corporal: (C): 342.00 ± 10.98 g; (A): 170.73 ± 15.68 g ($P < 0.05$). 2.-Peso testicular: (C) 3.00 ± 0.01 g; (A) 2.47 ± 0.20 g ($P < 0.05$). 3.-Peso epididimario: (C) 857.25 ± 4.71 mg, (A) 571.25 ± 95.15 mg ($P < 0.05$). 4.-recuento de espermatozoides: (C) 68240.56 ± 952.17, (A) 63297.95 ± 6236.46 espermatozoides /mg tejido epididimario (n.s.). Asimismo, histológicamente se encuentra afectado el epitelio testicular y epididimario. La histología epididimaria muestra túbulos de bordes epiteliales irregulares, menor contenido de espermatozoides y presencia de células nucleadas (75 días). Se observan

precozmente lesiones testiculares que consisten en la separación de espermatozoides de las espermatogonias, que es seguido de espacios intercelulares entre células germinales y presencia de acúmulos celulares intraluminales (105 días). Desde la primera semana postaloaxano se observan lesiones en el epitelio germinal que sugerirían un efecto tóxico del aloxano.

334. (6977) EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LITIO EN EL EJE HIPÓFISO-GONADAL EN LA VIZCACHA. GARCÍA ASEFF, SUSANA BEATRIZ; FUENTES, LUCÍA

Farmacología. UNSL

Litio, es una droga que se usa en el tratamiento de la manía aguda y en la profilaxis de los desórdenes bipolares maniaco-depresivo. El objetivo del trabajo fue investigar si la administración crónica de Litio modifica los niveles circulantes de testosterona, estradiol, LH y FSH, para evaluar si el eje hipofisogonadal es un probable blanco de la acción de Li. Se utilizaron vizcachas adultas (*Lagostomus maximus maximus*) machos (n:6) y hembras (n:6), se les inyectó una dosis diaria de CLLI (SIGMA) de 1 mEq/kg, i.p., durante 30 días (Li) y S.F. al grupo control (C). Se extrajo sangre y muestras de hipófisis y gónadas. Se determinó Li por Absorción atómica en suero e hipófisis, LH por RIA doble heterólogo, FSH por valoración inmunoradiométrica magnética (FSH MAIA clone) en homogenatos hipofisarios, testosterona (T) y estradiol (E) en plasma por RIA (Tesone y col., 1976) y se aplicaron técnicas histológicas de microscopía óptica en hipófisis, testículo y ovario. Li sérico (mmol/ml): Machos 0.61±0.071, Hembras 0.14±0.004 p<0.005. Li hipofisario (mmol/g tejido): Machos 0.75±0.082, Hembras 1.46±0.365 p<0.001. LH hipofisaria (ng/ml): Machos 4.81±0.30(Li), 4.83±0.42 (C) n.s.; Hembras 1.49±0.11 (Li), 4.75±0.31(C) p<0.05. LH sérica (ng/ml): Machos 0.86±0.10 (Li), ND(C); Hembras ND (Li), ND (C). FSH hipofisaria (mUI/ml): Machos 16.78±1.90 (Li), 14.51±2.08 (C) n.s.; Hembras 8.63±1.59 (Li), 15.62±1.3 (C) p<0.005. T (ng/ml) 1.41±0.76 (Li), 1.28±0.35 (C) n.s. E(ng/ml) 2.59±0.69 (Li), 2.19±0.46 (C) n.s. Las técnicas histológicas evidenciaron que Li produce modificaciones en el número de gotas coloidales PAS (+) presentes en la pars distalis: 12±1.8 gotas coloidales/campo (Li) y 24±1.8 gotas coloidales/campo (C); disminución de la actividad espermatogénica en testículo y procesos degenerativos en folículos ováricos con alto grado de vacuolización e invasión de macrófagos. Los resultados indican que el tratamiento crónico con Li produjo modificaciones bioquímicas e histológicas en el eje hipofisogonadal en este roedor, significativamente mayores en hembras.

335. (7099) REGULACIÓN POR PROGESTERONA DE LA ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN TEJIDO VASCULAR. RAUSCHEMBERGER, MARÍA BELÉN; MENDIBERRI, JOSEFINA; SELLES, JUANA; MASSHEIMER, VIRGINIA

Cátedra de Análisis Clínicos II. Dto. Biología, Bioquímica y Farmacia. UNS

Previamente demostramos que en tejido aórtico de rata, la Progesterona (Pg), estimula la producción de óxido nítrico (NO) en forma no genómica e independiente de la participación del receptor nuclear. Como consecuencia del aumento en NO, la Pg activa la ciclooxigenasa y estimula la síntesis de prostaciclina. En este trabajo investigamos las vías mensajeras involucradas en la regulación de NOS por la Pg. Para ello empleamos anillos de aorta aislados de ratas hembras en edad fértil, tratados «in vitro» con concentraciones fisiológicas de Pg. La actividad NOS se midió usando la técnica de radioconversión de (3)H-arginina en (3)H-citrulina. Los ensayos tiempo respuesta muestran que, 5 min. de tratamiento con la hormona estimulan la síntesis de NO en un 98% sobre el control (p<0.05), aumentando a 116% (p<0.01) a los 15 min, siendo máximo a los 30min (146%, p<0.01). La acción estimuladora de la hormona se manifiesta entre 1 y 100 nM. Para estudiar la participación del sistema TK y PI3K en el mecanismo de activación de NOS por Pg, se midió

la actividad NOS en presencia ó ausencia de genisteína (inhibidor de TK) ó del compuesto LY 294002 (inhibidor de PI3K). Demostramos que el sistema tirosin kinasa participa en la acción de la hormona. El incremento en NO inducido por Pg luego de 5 min. de tratamiento, fue suprimido por Genisteína 1 µM (0.37±0.13 vs 0.68 ±0.09, p<0.05; 0.44 ±0.07 vs 0.40±0.07, control vs Pg en ausencia ó presencia de genisteína). El mismo efecto supresor se obtuvo en presencia de LY 294002 1µM. De acuerdo a lo que reportamos previamente, la acción no genómica de Pg involucra la activación PLC y el consecuente aumento de los niveles de diacilglicerol (activador de PKC). Usando chelerythrine como inhibidor de PKC, observamos que 1 y 10 µM chelerythrine suprime totalmente el aumento en NO inducido por 5 ó por 30 min. de tratamiento hormonal. Los resultados obtenidos sugieren que, en tejido vascular, la acción estimuladora de Pg sobre NOS es mediada por los sistemas TK, PI3K y PKC.

336. (7110) VÍAS METABÓLICAS INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA DEL TEJIDO AÓRTICO AL TRATAMIENTO CON ESTRONA. MASSHEIMER, VIRGINIA ; POLINI, NÉLIDA; ALVAREZ, CRISTINA; BENOZZI, SILVIA; SELLES, JUANA

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

Previamente en nuestro laboratorio se demostró que la estrona (E1) ejerce su acción sobre el tejido vascular activando NOS y COX por mecanismos no genómicos que involucran a PLA2 y PLC. Contrariamente a reportado para el E2, la E1 activa la NOS en forma independiente de la entrada de Ca²⁺ extracelular y la activación de COX resulta en un incremento no solo de PGI₂ sino que también de Tx. Los efectos directos de la E1 sobre el tejido aórtico, desaparecen en ausencia de actividad ovárica. En este trabajo estudiamos las vías metabólicas que median la respuesta del tejido aórtico a la E1 y que podrían ser regulados por el E2. Se comprobó que el tratamiento «in vivo» de ratas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) con 50 mg/kg/día E2 por 5 días, restituyó el incremento en la producción de NO inducida por E1 (50% sobre el control). Utilizando anillos de aorta de rata (RAS) obtenido de animales fértiles se caracterizó la activación de la NOS por E1. El perfil temporal mostró que 5 minutos de tratamiento con E1 incrementa significativamente la producción de NO (69% sobre el Control, p<0,01), disminuyendo ligeramente hasta los 20 minutos de tratamiento 38% p<0,05). La E1 estimula la NOS en forma dosis dependiente siendo máximo estímulo con 10 nM (86% sobre control). Se estudió la participación de la PI3K en la activación de NOS inducida por la E1. La preincubación del tejido con los inhibidores de dicha quinasa, Ly 294002 y Wortmannin no afecta el incremento de NO inducido por 5 min. de tratamiento con E1 (1, 22 vs 2.07 pmol/mg prot (-Ly), y 1,67 vs 2,7 pmol/mg prot (+Ly)). La presencia de Wortmannin tampoco afectó el estímulo inducido por E1, 20 min.. Por el contrario la inactivación de PI3K por Ly 294002 suprime el incremento de DAG inducido por 5 min. de tratamiento con E1. Estos resultados sugieren que la PI3K no participa en la acción estimuladora de E1 sobre NOS pero si regula la activación hormonal de PLC.

337. (7255) EFECTO INHIBITORIO DE HISTAMINA (HA) MEDIADO POR ÓXIDO NÍTRICO (NO) SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN CÉLULAS DE LEYDIG. MONDILLO, CAROLINA; RECHE, CECILIA; PATRIGNANI, ZORAIDA; MARAZITA, MARIELA; PIGNATARO, OMAR

Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales IBYME-CONICET

Previamente demostramos que HA 10(-5) M inhibe la esteroidogénesis basal y estimulada por hCG en células MA-10 y células de Leydig de rata. También mostramos que HA 10(-5) M es capaz de aumentar la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en ambos tipos celulares, sugiriendo la posible

participación de óxido nítrico (NO) como mediador del efecto inhibitorio de HA sobre la síntesis de esteroides. Objetivo: Caracterizar el/los mecanismos involucrado/s en el efecto inhibitorio de HA sobre la esteroidogénesis en células MA-10 y Leydig de rata, confirmando la participación de NO. Métodos: Se midieron los niveles de Progesterona (Pg) y testosterona (T) por RIA. Los niveles de inosítoles fosfato (IPs) se determinaron utilizando columnas Dowex. Resultados: En células MA-10, HA 10(-5) M disminuyó los niveles de Pg estimulados por 22-R-colesterol (77% de inhibición), pero no los estimulados por pregnenolona. L-NAME, inhibidor específico de NOS, revirtió el efecto inhibitorio de HA sobre la esteroidogénesis basal (En ng/10(6) cél.: Basal: 1,95 ± 0,11; HA 10(-5) M: 1,34 ± 0,16; L-NAME: 2,65 ± 0,17; L-NAME + HA 10(-5) M: 2,81 ± 0,23) y estimulada por concentraciones submáximas de hCG (datos no mostrados). Por otra parte, HA 10(-5) M aumentó los niveles de IPs (73% sobre los valores basales). Dado que IP[3] puede actuar liberando calcio de reservorios intracelulares, la vía dependiente de Ca(2+)/calmodulina podría estar involucrada en la activación de NOS por HA 10(-5) M. Se obtuvieron resultados similares en células de Leydig de rata sobre la síntesis de T. En conjunto, resultados obtenidos y evidencias previas sugieren que HA 10(-5) M inhibe la esteroidogénesis en células de Leydig actuando sobre las enzimas dependientes de citocromo P450, siendo NO el mediador involucrado en dicho efecto.

338. (7324) PREPROTRH178-199 REGULA LA EXPRESIÓN DE TIROSINA HIDROXILASA EN NEURONAS DEL NÚCLEO ARCUATO DURANTE EL PROESTRO DE LA RATA Y PARTICIPA EN LA PRODUCCIÓN HIPOFISARIA DE PROLACTINA. GOLDSTEIN, JORGE (1,2); NILLNI, EDUARDO (1)

Lab. Fisiopatología, Dept. Fisiología, Fac. Medicina, UBA, Paraguay 2155 Piso 7, Cap. Fed./Div. Endocrinología, Esc. Medicina, Univ. Brown, EEUU (2) Depto. Fisiología, Fac. Medicina, UBA

PreproTRH178-199 es un péptido derivado del procesamiento de la proHormona Liberadora de Tirotrófina (proTRH). Hemos demostrado el aumento en la síntesis de preproTRH178-199 en el núcleo paraventricular del hipotálamo y en la eminencia media (ME) de ratas madres en lactancia. Además el péptido indujo la liberación de prolactina en cultivos hipofisarios (Nillni et al., *Endocrinology* (2001) 142:896-906). Neuronas del núcleo arcuato (ARC) producen la enzima tirosina hidroxilasa (TH), involucrada en la síntesis de dopamina y en la regulación de la liberación de prolactina hipofisaria durante el ciclo estral de rata. Se sabe que la prolactina es máxima en el proestro (pre-ovulatorio) y basal en el diestro (post-ovulatorio). El objetivo de nuestro trabajo fue determinar si la liberación de prolactina en el ciclo estral podría deberse a la acción de preproTRH178-199 sobre neuronas dopaminérgicas del ARC. Ratas Sprague-Dawley fueron anestesiadas y fijadas; secciones del cerebro fueron procesadas para estudios de binding (bi) con preproTRH178-199 biotinilado y/o inmunofluorescencias para TH (TH-IF) y proTRH (proTRH-IF). Además se utilizaron cultivos hipotalámicos para estudiar los efectos de preproTRH178-199 en la expresión de TH por Western Blot (WB). El bi de PreproTRH178-199 fue mayor en el proestro que en el diestro en el ARC y en la ME, al igual que el número, intensidad y tamaño de neuronas TH-IF distribuidas en las regiones dorsomedial y ventrolateral del ARC. La doble localización entre el bi de preproTRH178-199 y TH-IF fue detectada en somas y fibras TH inmunopositivas del ARC en el proestro; y fibras proTRH-IF contactaron neuronas TH-IF. Finalmente, en estudios de WB la preproTRH178-199 inhibió la expresión de TH en forma dosis dependiente en cultivos hipotalámicos. Los resultados presentes indicarían que preproTRH178-199 regula la liberación de prolactina hipofisaria en el proestrus de rata mediante su acción en neuronas dopaminérgicas del ARC.

339. (7510) EFECTO DE LA INCUBACIÓN CON MELATONINA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO DE MITOCONDRIAS

DE CORAZÓN. REYES TOSO, CARLOS FELIPE; RICCI, CONRADO R.; DE MIGNONE, INES R.; LINARES, LAURA M.; ZANINOVICH, ANGEL; CARDINALI, DANIEL P.

Departamento de Fisiología y Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. UBA. Paraguay 2155 Piso 7.

En estudios anteriores se demostró que la incubación con melatonina (Mel) disminuye el incremento del consumo de oxígeno (VO₂) de mitocondrias hepáticas que se produce cuando se incorporan sustratos del ciclo de Krebs y ADP al medio. Continuando con este trabajo, se decidió evaluar si el mismo efecto se producía a nivel de las mitocondrias del corazón. Se incubaron mitocondrias extraídas de ratas de 5 meses de edad con Mel en concentraciones de 10(3) a 10(8) M realizando una curva dosis respuesta acumulativa. El VO₂ se midió por un procedimiento polarigráfico empleando β-hidroxiubutirato (β-HB), succinato (SU) y malato (MA) como sustratos en presencia de ADP (estado 3). Los resultados obtenidos se expresaron en ng atomo O₂/min(1)/mg proteína mitocondrial(1). La Mel entre las concentraciones de 10(3) y 10(4) redujo el incremento provocado por la adición de β-HB y ADP al medio en forma significativa vs Controles (52.88 ± 2.52; 55.25 ± 2.93 vs 72 ± 2.75, p < 0.001). La Mel 10(5) también provocó una reducción pero de menor magnitud (68.25 ± 2.30 vs 72 ± 2.75, p < 0.01). Resultados similares se produjeron con Mel entre 10(3) y 10(6) M al agregar SU (87,38 ± 2.22, 91,63 ± 2.25; 109,5 ± 1.88, 112,4 ± 1.73 vs 116.9 ± 2.3) y MA (75,63 ± 2.51, 77,75 ± 2.56, 97,38 ± 3.16, 98,25 ± 3.23 vs 102.5 ± 3.34), siendo significativos para ambos casos (p < 0.001). Estos resultados muestran que la Mel también es efectiva para reducir el incremento del VO₂ en las mitocondrias de corazón. Este efecto resulta de interés si se tiene presente que la formación de especies reactivas del O₂ es mayor en los casos en que el suministro de sustratos procedentes del ciclo de Krebs está incrementado. En dichas circunstancias la Mel podría ejercer un papel protector de la mitocondria al evitar un aumento desmesurado del VO₂.

340. (7831) INFLUENCIA DEL GANGLIO MESENTÉRICO SUPERIOR(GMS) A TRAVÉS DEL PLEXO NERVIOSO OVÁRICO (PNO) SOBRE LA FISIOLÓGIA OVÁRICA. SOSA, ZULEMA; VEGA, ADRIANA; VALLCANERA, SANDRA; VILLEGAS, NELSON; RASTRILLA, ANA

Laboratorio Biología de la Reproducción (LABIR)

El PNO es una extensión de los plexos aórticos y renal. Esta vía inerva fundamentalmente los vasos sanguíneos y células de la teca. Está compuesto por fibras sensoriales y simpáticas. La mayoría de las fibras que lo constituyen hacen sinapsis en el GMS, verdadera estación de relevo en el trayecto de las fibras aferentes y eferentes entre el SNC y el ovario. El objetivo del presente estudio es dilucidar el papel que juega el GMS a través del PNO sobre la liberación de esteroides ováricos en un estado de profundos cambios vasculares y estructurales como es el Estro (E). Se estandarizó un sistema integrado in vitro GMS-PNO-O derecho e izquierdo en ratas adultas. Se adicionó Acetilcolina(Ach) en el compartimento ganglionar y se midió por RIA la liberación de androstenodiona (A2), estradiol (E 2) y progesterona (P) en el líquido de incubación ovárico a los 15, 30, 60, 120 min. Se aplicó test de Student con una significancia de p < 0.05. Los resultados se expresan en pg/mg ovario ± SEM. Los valores controles de A2: Der: 15min: 27.3 ± 1; 30: 32.6 ± 4; 60: 37 ± 4; 120: 37 ± 1; Izq. 15: 41 ± 4; 30: 33 ± 1; 60: 31 ± 0.6 y 120: 33 ± 0.6; E 2-Der.: 15: 13 ± 3; 30: 29.5 ± 3; 60: 24.3 ± 4 y 120: 46.1 ± 1.0; Izq: 15 min: 66 ± 5; 30: 78 ± 3; 60: 61 ± 1 y 120: 41 ± 2. P Der: 15min: 29.5 ± 10; 30: 38 ± 10; 60: 39 ± 11; 120: 43.5 ± 1; Izq. 15: 40.5 ± 10; 30: 55.5 ± 1; 60: 78 ± 0.7 y 120: 77 ± 2. La adición del agente colinérgico en ganglio modificó la liberación de los esteroides ováricos estudiados en forma diferente en los sistemas izquierdo y derecho. Conclusiones: El plexo ovárico interviene en la liberación de esteroides ováricos, posiblemente en un efecto cooperativo con el nervio ovárico superior. Con Estradiol se observa que aunque hay diferenciación estructural las células granulosa están con gran actividad esteroidogénica

en esta etapa del ciclo estral. Queda así claramente observado las diferencias en la fisiología del ovario derecho con respecto al izquierdo por influencia neural.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS 1: BACTERIOLOGÍA

341. (6852) LA INFECCIÓN POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA REGULA LA PRODUCCIÓN DE NITRITOS EN UN MODELO INFLAMATORIO POR INJURIA TÉRMICA EN RATONES: PÉRDIDA DE LA REGULACIÓN DURANTE UNA RESPUESTA TH1. VALDEZ, JUAN CARLOS; CALAFAT, MARIO; PERAL, MARIA C; FRANCHI, ANA; PÉREZ LEIRÓS, CLAUDIA

Cátedra de Inmunología, F Bioquímica, Q y F, Universidad Nacional de Tucumán Depto de Química Biológica FCEN-UBA-CONICET, CEFYBO-CONICET

La *P.aeruginosa* (*P.a*) modifica la síntesis de algunos mediadores y el perfil de citoquinas al infectar lesiones inflamatorias, favoreciendo el progreso a una infección crónica. Se ha demostrado que la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en células de 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. Con el fin de investigar si este mecanismo regulatorio participa en la infección por *P.a.*, estudiamos la producción de NO en un modelo de inflamación por injuria térmica e infección en ratones BALB/c y NOD (diabéticos no obesos). Determinamos la producción de nitritos por Griess, la actividad de arginasa por producción de urea, la expresión de iNOS por inmunocitoquímica y las UFC/g tejido a las 6 y 24 h. Ratones BALB/c y NOD quemados (Q) se infectaron intralesionalmente con 200 UFC (QI). La *P.a* indujo una disminución de nitritos en el exudado inflamatorio en ratones normales a las 6hs (uM) Q: 11.9 ± 0.2 ; QI: 6.5 ± 0.7 ; n=4; P < 0.05. A las 24 h se mantuvo el efecto regulatorio negativo de la infección. En ratones NOD no se observó este efecto a 6 ni 24 h. La disminución de la concentración de nitritos en BALB/c se asocia a una menor expresión de iNOS en células no adherentes, a un menor número de UFC/g (P < 0.05) en la lesión y en el bazo con respecto a NOD y no se debe a un aumento de la actividad de arginasa. Los resultados indican que la infección por *P.a.* de una lesión inflamatoria induce una disminución en la producción de nitritos en ratones normales que no depende de la actividad de arginasa y está asociada a una resolución más rápida de la infección. En ratones NOD con una respuesta Th1 subyacente esta regulación no se observa.

342. (6926) FENOTIPO Y FUNCIÓN DE LA POBLACIÓN MONOCÍTICA EN NIÑOS CON SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH). FERNÁNDEZ, GABRIELA C; GÓMEZ, SONIA; RAMOS, MARÍA V; BENTANCOR, LETICIA; BARRIONUEVO, PAULA; EXENI, RAMÓN (1); GRIMOLDI, IRENE (1); ALDUNCÍN, MARTA (1); VALLEJO, GRACIELA 2; ISTURIZ, MARTÍN; PALERMO, MARINA

División Inmunología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina; Serv. Nefrología de los Hospitales: (1) Municipal de San Justo (2) Ricardo Gutiérrez

El SUH provoca falla renal aguda en niños, y está asociado con infecciones por bacterias productoras de toxina Shiga (Stx). Evidencias experimentales y clínicas demuestran que la respuesta inflamatoria potencia la toxicidad de la Stx. Así, mediadores inflamatorios producidos sistémica o localmente podrían contribuir en la fisiopatogenia del SUH. Nuestro objetivo fue investigar el fenotipo y función de los monocitos (Mo) de pacientes con SUH. Se extrajo sangre periférica de niños con SUH (n=20), sanos (SC, n=25), urémicos agudos (UC, n=10), y neutrofilicos (NC, n=15), y se evaluó la expresión en membrana de distintos marcadores de Mo por citometría de flujo. Se aislaron las células mononucleares, y se determinaron la producción de TNF por

LPS utilizando L929, y la generación de intermediarios reactivos del oxígeno (IROS) inducida por PMA usando dihidrorodamina. Comparado con los SC, los Mo de los SUH presentaron una disminución en la intensidad media de fluorescencia (IMF) del CD14, CD64 y CD11b (CD14: SUH=771±104;SC=1699±219; CD64: SUH=95±12;SC=167±16; CD11b: SUH=74±7; C=133±13, p<0.01). Los Mo de los SUH mostraron un aumento en el porcentaje (%) e IMF del CD16 (%: SUH=21±2;SC=11±1; IMF: SUH=308±50;SC=93±16, p<0.05). Si bien la producción de TNF inducida por LPS fue menor en los Mo de los SUH (LPS/producción basal: SUH=4.6±1.3;SC=13.3±3.9, p<0.05), la generación de IROS por PMA fue 2 veces mayor que la de los SC (p<0.05). La IMF del CD14 se encontró disminuida en los UC y NC, pero la del CD64, CD11b y CD16 fue comparable a los SC. El % de Mo CD16+ en los UC fue similar al de los SC, y en los NC similar al de los SUH. Los pacientes con SUH presentan un patrón fenotípico y funcional alterado en su población de Mo, que podría deberse a una activación o maduración de los mismos como resultado de la infección asociada a la Stx.

343. (7168) ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTICUERPOS DE ISOTIPO IgM E IgA ASOCIADOS A SÍFILIS SECUNDARIA. REPETTO, MARISA(1); FERRAROTTI, NIDIA (2); PIZZIMENTI(SAI), CRISTINA (2); DALGHI, MARIANELA (1); GRIEMBERG(SAI), GLORIA (2)

Química General e Inorgánica. FFyB. UBA. Bs As; Inmunología Clínica. Dpto. Bioquímica Clínica. FFyB. UBA. Bs As.

La sífilis es una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuentes, que ha resurgido actualmente. El daño tisular generado por la infección con *Treponema pallidum* (Tp) podría desencadenar daño oxidativo en los pacientes. El objetivo de este trabajo fue evaluar la existencia de estrés oxidativo mediante la determinación de marcadores periféricos: a) niveles de antioxidantes endógenos no enzimáticos en plasma (TRAP) y en eritrocitos (glutathión total, GSH); b) actividad de enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión transferasa (GT) y glutatión peroxidasa (GPx). Se estudió una población joven de 14 individuos con serología positiva (VDRL, TPHA y FTA), sin enfermedades asociadas, comparada con un grupo control de 20 sujetos jóvenes sanos (33 ± 3 años). En los 14 pacientes se observaron anticuerpos anti Tp de isotipos IgM e IgA, considerados marcadores de proceso activo. También se observó disminución del TRAP del 53% (p<0,0001) respecto a los controles (valor control \pm ESM (vc): $273 \pm 9 \mu\text{M}$ Trolox) y del 87% (p<0,0001) en el contenido de GSH total (vc: $2.7 \pm 0.3 \mu\text{mol/mL}$ eritrocitos). También se observó una disminución de la actividad de CAT (63%, p<0,0001, vc: $3.8 \pm 0.2 \text{ pmol/mg prot}$), SOD (76%, p<0,0001, vc: $0.74 \pm 0.04 \text{ U/mg prot}$), GPx (38%, p<0,005, vc: $0.07 \pm 0.01 \mu\text{mol/min mg prot}$) y GT (58%, p<0,0001, vc: $26 \pm 5 \mu\text{U/mg prot}$), respecto a los controles. El estrés oxidativo está involucrado en el desarrollo de sífilis, la generación de especies reactivas del oxígeno sería inducida por el huésped y por el Tp, coincidiendo con la presencia de Ac de isotipo IgM e IgA. La progresión de la enfermedad hacia estadios más severos estaría relacionada al daño oxidativo y podría evaluarse a través de los marcadores periféricos de estrés oxidativo en forma conjunta con la serología IgA/IgM.

344. (7177) INTRACELULARIDAD DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN CÉLULAS MAC-T: ESTUDIOS MICRO-BIOLÓGICOS Y CITOLÓGICOS. ALVAREZ, LUCIA; TUCHSCHERR, LORENA; BARBAGELATA, MARÍA SOL; LATTAR, SANTIAGO; BUZZOLA, FERNANDA; SORDELLI, DANIEL

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA

Staphylococcus aureus infecta la glándula mamaria ocasionando diversos tipos de mastitis en rumiantes de importancia económica. La supervivencia intracelular de *S. aureus* jugaría un papel preponderante en las infecciones persistentes y/o crónicas.

La capacidad de *S. aureus* para invadir células eucariotas ha sido investigada empleando cepas de referencia, pero estos resultados no serían representativos de los eventos observados con aislamientos clínicos. Por ello, se estudió la capacidad de aislamientos clínicos de *S. aureus* provenientes de bovinos con distintos tipos de mastitis para sobrevivir intracelularmente en células epiteliales mamarias (MAC-T). Por medio del ensayo de invasión protegida por gentamicina se determinó el número de bacterias viables internalizadas. Cada aislamiento clínico bovino de *S. aureus* demostró ser capaz de invadir las células MAC-T. Sin embargo, las cepas de referencia se internalizaron en mayor grado y sobrevivieron por tiempos prolongados en el interior celular. Cuando se investigó la influencia del PC sobre la adherencia e internalización de *S. aureus* se estableció que la habilidad de invasión celular de la cepa capsulada (Medianas a T[2h]: 1696 ufc/ml y T[24h]: 396 ufc/ml) fue significativamente menor respecto de la no capsulada (T[2h]: 2.9x10(4) ufc/ml y T[24h]: 3x10(3) ufc/ml; T[2h] vs T[24h]: p=0.01 y p=0.04, respectivamente; Mann Whitney test). En aquellas cepas aisladas de vacas con mastitis subclínica que mostraron ser agr tipo II y cap8 positivos (362 ufc/ml) se observó una capacidad de internalización significativamente mayor respecto de la determinada con las cepas aisladas de vacas con mastitis clínica (10 ufc/ml; p=0.001). La capacidad de inducir apoptosis de las células MAC-T fue variable para los diferentes aislamientos clínicos bovinos estudiados. La persistencia de *S. aureus* en la glándula mamaria estaría favorecida en aquellas cepas que no expresan cápsula y que no inducen la apoptosis celular.

345. (7273) RELACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE FOSFOLIPASAS POR CANDIDA ALBICANS Y BACTERIAS PREVALENTES DEL ECOSISTEMA VAGINAL. OMBRELLA, ADRIANA (1) ; FORNASO, CAROLINA (1); BELMONTE, ADRIANA (1); NOGUERAS, MÓNICA (1); RUIZ ABAD, ISABEL (2); RAMOS, LAURA (3); DLUGOVITZKY, DIANA (1)

(1) *Cat. de Microbiología. Fac. de Cs. Médicas. UNR.*; (2) *Cát. Ginecol. Fac. Cs. Méd.* (3)*Cát. Micología. Fac. Cs Bioquím. y Farmac. UNR.*

La candidiasis vulvovaginal (CVV) representa el 85- 90% de las vaginitis, siendo *Candida albicans*(Ca) la especie predominante. Habitualmente suele encontrarse como único agente etiológico de vaginitis, conservándose la prevalencia de *Lactobacillus spp.*(LD) en la flora bacteriana acompañante. En un trabajo previo hemos detectado 23% de asociación de Ca con *Gardnerella vaginalis* (Gv), bacteria índice de la vaginosis bacteriana (VB). Las fosfolipasas (PL), uno de los factores de patogenicidad de Ca, juegan un importante rol en la disrupción de las membranas celulares, favoreciendo la invasión del epitelio por la fase hifal. El objetivo de este trabajo fue determinar la producción de esta enzima en las cepas de Ca recuperadas de CVV con y sin asociación de vaginosis bacteriana. Se estudiaron 82 aislamientos de Ca, 28 provenientes de secreciones vaginales con LD como flora bacteriana preponderante y 54 con predominio de Gv. Para la detección de la actividad de PL se utilizó el método en placa, en dos medios de cultivo: agar malta yema de huevo y agar Sabouraud glucosado yema de huevo. Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como el índice de actividad fosfolipasa (Pz). El análisis estadístico de los datos no mostró diferencia significativa entre ambos grupos. Está demostrado que la patogenia de la candidiasis vulvovaginal, como así también de la vaginosis bacteriana es multifactorial, por lo cual es necesario profundizar el estudio de la influencia de la flora bacteriana predominante sobre los demás factores de virulencia de Ca.

346. (7366) EFECTO DE LA STX SOBRE MONOCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS IN VIVO E IN VITRO. ESTUDIO DEL RECEPTOR PARA FRACTALKINA. RAMOS, MARÍA VICTORIA; FERNÁNDEZ, GABRIELA C; BENTANCOR, LETICIA; CAMERANO, GABRIELA 1; DRAN,

GRACIELA 1; EXENI, RAMÓN 2; ALDUNCÍN, MARTA 2; ISTURIZ, MARTÍN; PROULX, FRANÇOIS 3; PALERMO, MARINA

División Inmunología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina; Med Exp, ILEX, ANM; 2 Hosp Municipal del Niño, San Justo; 3 Ste Justine Hosp, Montreal, Canada

Si bien el agente etiológico del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es la toxina Shiga (Stx) producida por *E. Coli*, en su patogénesis estarían implicados la respuesta inflamatoria y los monocitos. La fractalkina (CX3CL1) es una quimioquina de transmembrana expresada en glomérulo renal e implicada en la patogénesis de procesos inflamatorios renales. Su receptor CX3CR1 se expresa en NK y monocitos (Mo) mediante mecanismos de adhesión integrina-independientes. El objetivo fue investigar los efectos biológicos de Stx y LPS sobre la expresión de CX3CR1 en Mo humanos. Se midió dicho marcador en sangre entera de niños con SUH en fase aguda (n=14) y niños sanos (n=10) por citometría de flujo. En los controles la mayoría de los Mo fueron CX3CR1+/CD16- (74±4%) mientras que las células doble positivas (DP) representaron un 11±4% y las doble negativas (DN) 15±3%. Los SUH mostraron una reducción de las células CX3CR1+/CD16- (42±6%, p<0.005) pero un aumento en el porcentaje de DP (20±2%, p<0.02) y DN (35.5±5, p<0.01). En el subset de DP, la intensidad media de fluorescencia (IFM) del CD16 se encontró aumentada en los SUH con respecto a los controles (316±60 vs. 176±44; p<0.05) pero la IFM del CX3CR1 se encontró disminuida (68±7 vs. 89±5, p<0.04). Para determinar los efectos in vitro de la Stx/LPS en la expresión de CX3CR1, se purificaron Mo de adultos sanos mediante un gradiente de Percoll. La incubación per se durante 24 hs disminuyó significativamente la expresión de CX3CR1 (53±9% vs. 2.9±%, p<0.002) y ninguno de los estímulos ensayados (Stx, LPS, TNF, IL1β) modificó estos valores. Concluimos que Stx y/o LPS in vivo inducen un proceso inflamatorio donde aumenta una subpoblación de Mo activados. La pérdida del CX3CR1 podría ser consecuencia de esta activación o de un reclutamiento específico de esta subpoblación al riñón luego de la interacción CX3CR1-CX3CL1 en el endotelio.

347. (7401) DESARROLLO EXPERIMENTAL DE ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS Y/O PREVENTIVAS PARA EL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH). BENTANCOR, LETICIA VERONICA 1; BILEN, MARCOS 1; CAMERANO, GABRIELA; RAMOS, MARÍA V.; FERNÁNDEZ, GABRIELA C; GHIRINGHELLI, DANIEL 1; PALERMO, MARINA

Inmunología, IIHEMA, ANM; Lab. de Ing. Genética y Biología Celular y Molecular, UNQ (1) Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular. Univ. Nac. de Quilmes

La infección con *E.coli* productoras de toxina Shiga (Stx) causa colitis hemorrágica y en lactantes puede complicarse en la forma de síndrome urémico hemolítico (SUH). Debido a que el 30% queda con secuelas neurológicas y/o falla renal, constituye un serio problema de salud pública. A la fecha no existen tratamientos específicos ni vacunas. El objetivo de este trabajo es obtener un inmunógeno genético capaz de expresar una proteína derivada de la toxina shiga, no tóxica, que induzca una respuesta humoral con actividad neutralizante para Stx2. Construcciones plasmídicas: la secuencia de la Stx2 sin el sitio activo (Stx2 deltaAB) fue clonada en un vector procariota (pGEMT), para producción de la proteína y la misma en un vector eucariota (pcDNA3.1) para ensayos de transfección (en células COS 7 con lipofectina) e inmunización de ratones Balb/c. La expresión en células eucariotas y en células procariotas dió el mismo patrón de bandas en WB. La proteína no resultó tóxica sobre células Vero y el plásmido no indujo en los ratones efectos tóxicos específicos a largo plazo (2,4 y 6 meses). Ratones Balb/c adultos, fueron inmunizados i.m. con 50 µg del plásmido los días 0 y 14. Otro grupo fue inoculado tres días antes con el plásmido codificando para el GM-CSF. Los animales fueron sangrados a los 15, 30, 45 y 60 dpi. Se determinó la pre-

sencia de anticuerpos anti-Stx2 por WB. Estos sueros fueron luego evaluados en su actividad neutralizante de la Stx2 sobre células Vero. Encontramos que la coinyección con pGM-CSF induce un aumento en los anticuerpos anti-Stx2 y en la actividad neutralizante de Stx2. Estos resultados sugieren que es posible generar anticuerpos con fines terapéuticos con el fin de neutralizar la actividad de la toxina en los niños con diarrea sanguinolenta antes que derive en el desarrollo del SUH.

348. (7498) FACTORES DE VIRULENCIA PRESENTES EN VESÍCULAS CON DOBLE MEMBRANA LIBERADAS POR ESCHERICHIA COLI ENTEROAGREGATIVA. ALMIRÓN, MARTA (1); SANJUAN, NORBERTO (1,2); KOLTER, ROBERTO (1)

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM-CONICET; (1) Harvard Medical School, Harvard University (2) Dpto de Microbiología, Facultad de Medicina UBA

Las cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), además de causar diarreas crónicas, también están asociadas con la producción de enteritis y con el crecimiento deficiente en niños, aún en ausencia de diarreas. Nosotros hemos hallado y reportado anteriormente que la cepa 17-2 (prototipo de EAEC) libera al medio de cultivo vesículas con doble membrana y alto contenido de ácidos nucleicos durante la fase de crecimiento estacionario. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las proteínas contenidas en esas vesículas. Las vesículas se purificaron por dos métodos distintos: precipitación con PEG o filtración y posterior ultracentrifugación. Se obtuvieron dos fracciones principales a partir de gradientes de densidad discontinuos. La pureza de cada una de ellas fue determinada por microscopía electrónica con tinción negativa y por la ausencia de desarrollo bacteriano luego de su siembra en medio de cultivo LB. Se hicieron corridas electroforéticas en dos dimensiones con el objetivo de compararlas entre sí y con el patrón de las proteínas celulares, y se identificaron los spots por LC/MS. Los patrones proteicos fueron semejantes para las vesículas y contrastaron con el patrón de proteínas celulares. Entre las proteínas identificadas en las vesículas se encontraron la flagelina, FliC; las porinas OmpX y OmpA; la hemolisina HlyF; el antígeno Ag43; la lipoproteína mayoritaria, la mureinLP; y adhesinas, todas ellas involucradas en la virulencia bacteriana. Curiosamente, las adhesinas características de esta cepa no fueron identificadas, como tampoco otras proteínas mayoritarias de la membrana externa o interna de la bacteria productora de estas vesículas. Estos resultados, junto con la reproducibilidad de los perfiles proteicos y de los gradientes de densidad, sugieren que el contenido de las vesículas es consecuencia de un proceso fisiológico regulado que podría tener implicancias en las infecciones agudas y crónicas producidas por esta bacteria.

349. (7505) PATRONES DEL DNA CONTENIDO EN VESÍCULAS LIBERADAS POR ESCHERICHIA COLI ENTEROAGREGATIVA. ALMIRÓN, MARTA; SANJUAN, NORBERTO

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín-CONICET; Depto de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El DNA contenido en las vesículas de membrana externa producidas por bacterias Gram negativas es generalmente considerado como un contaminante incorporado durante el proceso de formación de las mismas. Sin embargo, ya hemos reportado antes que las vesículas que son producidas y liberadas por una cepa prototipo de *Escherichia coli* enteroagregativa durante la fase estacionaria tardía, contienen fragmentos grandes de DNA, que están fuertemente unidos a proteínas y a RNA. El objetivo del presente trabajo fue establecer si el DNA intravesicular tiene patrones distintos en diferentes aislamientos de la misma cepa bacteriana o si, por el contrario, el patrón es uniforme, empleando para ello el método de amplificación al azar del polimorfismo del DNA (RAPD). Se realizaron 5 cultivos de *E. coli* enteroagregativa

en medio LB pero en forma independiente y en distintos momentos. Los cultivos fueron mantenidos hasta alcanzar la misma densidad y las vesículas producidas fueron obtenidas del sobrenadante, que fue filtrado con membranas de 0,45 µm y ultracentrifugado. Los pellets fueron fraccionados en gradientes de sacarosa y las bandas de vesículas fueron observadas por microscopía electrónica con tinción negativa. Luego se trató a las vesículas indemnes con DNase para eliminar el eventual DNA exógeno y posteriormente se extrajo el DNA intravesicular por métodos clásicos. La amplificación se realizó con dos primers distintos y se utilizaron los DNA cromosomales de dos cepas no patógenas y el de la cepa enteroagregativa como controles. Los amplicones fueron separados por electroforesis en geles de agarosa. Se obtuvieron patrones idénticos para las fracciones más densas de las vesículas de los cinco cultivos. Se concluye que, si bien todavía no puede afirmarse que se trate de los mismos fragmentos de DNA, es muy probable que su empaquetamiento en estas vesículas de fase estacionaria no sea aleatorio y, por el contrario, responda a un proceso fisiológico aún no caracterizado.

350. (7678) LA AUSENCIA DE MICROCAPSULAS TIPOS 5 Y 8 DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS CONTRIBUYE A LA PERSISTENCIA EN LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATONES DESAFIADOS EXPERIMENTALMENTE. TUCHSCHERR, LORENA; BUZZOLA, FERNANDA R.; LEE, JEAN C.; DANIEL O., SORDELLI

Departamento De Microbiología, Facultad De Medicina, Univ. Buenos Aires.

El polisacárido capsular (CP) de *S. aureus* tipos 5 (CP5) y 8 (CP8) contribuye a la patogénesis de la infección intramamaria. Se investigó si la ausencia de CP5 o CP8 contribuye a una mayor persistencia de *S. aureus* en la glándula mamaria. Se inyectaron ratones CF1 por vía intramamaria con *S. aureus* en dosis desde 1x10(5) a 1x10(6) UFC de tres cepas de *S. aureus*: a) cepa Reynolds CP5+ (resistente a la estreptomina que expresa CP5). b) La cepa Reynolds CP8+ (cepa isogénica Reynolds resistente a estreptomina, que sólo expresa CP8). Y c) la Reynolds CP- (cepa isogénica Reynolds que no expresa CP y que es resistente a estreptomina y eritromicina). Se inyectaron dichas cepas en las glándulas mamarias número 4 izquierda (L4) y derecha (R4) de hembras en lactación en dosis de 1x10(5) a 5x10(6) por glándula. A distintos tiempos (días 1, 4, 8 y 12) se sacrificaron los animales y las glándulas L4 y R4 se removieron y homogeneizaron. Los homogenatos se cultivaron cuantitativamente y se determinó el número de UFC/glándula. No se encontraron diferencias significativas en las medianas de UFC recuperadas a los días 1 y 4. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los días subsiguientes. Ejemplo, para la dosis 1x10(5) UFC, día 8: CP- vs. CP5+ ó CP8+, p=0,0106 (n=6-12); misma dosis, día 12: CP- vs. CP5+ ó CP8+, p=0,0022 (n=8-14). Los riñones de los animales no mostraron signos de enfermedad, sugiriendo ausencia de diseminación. La inoculación de mezclas (50/50%) de la cepa no capsulada y una capsulada reveló una eliminación rápida semejante a la de las cepas capsuladas. La histopatología de las glándulas reveló menores signos de inflamación y daño en los animales inyectados con la cepa no capsulada. Nuestros resultados apoyan la hipótesis que las cepas no capsuladas de *S. aureus* presentan una ventaja sobre las CP5 y CP8 para persistir por períodos más prolongados en la glándula mamaria de ratonas madres en el período de lactación.

FARMACOLOGÍA 3: CONDUCTA

351. (6734) ACTIVACIÓN HISTAMINÉRGICA SIMULTÁNEA DE LA AMÍGDALA BASO-LATERAL Y ACCUMBENS DEL HEMISFERIO IZQUIERDO EN LA RATA: EFECTOS EN LA EXPLORACIÓN DE AMBIENTES CONFLICTIVOS. ALVAREZ, EDGARDO O.; BANZAN, ARTURO M.

Univ Nac Cuyo

Resultados previos de este laboratorio han mostrado que la estimulación con histamina (HA) de los receptores histaminérgicos del núcleo accumbens (ACC) y amígdala baso-lateral (ABL) derecha, inhiben la exploración en ambientes novedosos conflictivos. Con el objeto de evaluar si las neuronas histamino-sensibles de ambos núcleos presentan funcionalidad bilateral, se estudió si la estimulación histaminérgica del ACC y de ABL del lado izquierdo es capaz de reproducir los efectos encontrados en el lado derecho. Se trabajó con ratas macho adultas, implantadas en el ACC y ABL izquierdos. 48 h después, grupos de animales se microinyectaron simultáneamente con 45 nmol de histamina o salina (Sal) como control en ambos núcleos. En otro experimento, los animales fueron microinyectados primero con 45 nmol de pirilamina (antagonista histaminérgico H1, PYR) y 5 min después con 45 nmol de histamina. 5 min después, todos los animales fueron examinados en un laberinto en cruz elevado asimétrico (modelo de ambiente conflictivo). Los resultados mostraron que la exploración del brazo más atemorizante (SP), fue inhibida significativamente por la histamina (0 ± 2.6 s Vs 9.17 ± 3.01 s; HA Vs Sal, $p < 0.01$). Igual efecto se observó en los brazos menos conflictivos. Pirilamina bloqueó el efecto inhibitorio de histamina en la exploración del brazo «SP» (5.4 ± 2.5 s Vs 0 ± 2.6 s; PYR+HA Vs Sal+HA, $p < 0.05$), sin afectar la inhibición de la exploración de los otros brazos. En conclusión: los resultados sugieren participación parcial de receptores histaminérgicos H1 en la acción moduladora de histamina y funcionalidad bilateral de las neuronas histamino-sensibles de los núcleos ACC y ABL.

352. (6903) EFECTO DE MIDAZOLAM SOBRE LA REACTIVACIÓN-RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE MIEDO CONTEXTUAL: INFLUENCIA SOBRE LA REINSTAURACIÓN. BUSTOS, SILVIA (1); MALDONADO, HÉCTOR (2); MOLINA, VÍCTOR (1)

(1) Depto de Farmacología. Fac. Cs Qcas. Universidad Nacional de Córdoba; (2) Lab. de Neurobiol. de la Memoria. Fac. Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Una memoria consolidada al ser reactivada por señales asociadas al aprendizaje original, atraviesa por una etapa de labilización durante la cual puede ser afectada por agentes amnésicos, seguida por un proceso de reconsolidación. Numerosas líneas de investigación indican al GABA como modulador de la consolidación de memorias emocionales. En el presente trabajo investigamos el efecto de midazolam (MDZ), modulador positivo del receptor GABA A, sobre el proceso de reconsolidación de la memoria de miedo contextual. Ratas Wistar machos en el día 1 fueron condicionados al contexto (3 shocks, 0.7 mA, 3 seg de duración). Veinticuatro h. después, con el fin de reactivar el aprendizaje original, fueron re-expuestos 90 seg. al contexto condicionado o a un contexto novel y 1, 30, 60 o 120 min. después inyectadas con MDZ (1mg/Kg. i.p.) o salina. El día 3 y el día 13 se evaluó la respuesta de congelamiento, índice de la memoria de miedo, en el contexto condicionado. Con el propósito de evaluar la reactivación- reinstauración de la respuesta de miedo, los animales recibieron 1 shock de 0.2 mA en el día 14 y un día después se registró la reinstauración de dicha conducta. MDZ inyectado 1, 30 y 60 min. post-reactivación, produjo un deterioro estadísticamente significativo ($P < 0.05$) de la memoria de miedo, sin efecto cuando el tratamiento fue hecho 120 min. después. Los animales inyectados 1 y 30 min. post-reactivación no expresaron el día 13 recuperación espontánea, ni reinstauración de la respuesta de miedo. Estos resultados sugieren: 1) MDZ produce un efecto amnésico sobre la reconsolidación de la memoria de miedo contextual. 2) Existe un período de sensibilidad a este efecto de hasta 120 min. 3) El efecto es persistente y no transiente. 4) MDZ previene la reinstauración de la respuesta de miedo.

353. (6963) DAÑO CEREBRAL INDUCIDO POR ADMINISTRACIONES CRÓNICAS DE ALCOHOL EN MACHOS Y HEMBRAS WISTAR: EVALUANDO DIFERENCIAS SEXUALES

EN UN MODELO ANIMAL DE NEUROPATOLOGÍA ALCOHÓLICA. MANZINI, FERNANDO RUBÉN; DE OLMOS, JOSÉ SEVERO

INIMEC - Laboratorio de Neuroanatomía Experimental.

Estudios clínicos y experimentales han reportado que aunque las administraciones crónicas de alcohol inducen un mayor déficit cognitivo en hembras que en machos, ambos sexos manifestarían una neuropatología equiparable. Una explicación para tales hallazgos sería que las técnicas utilizadas no han sido las más adecuadas a los fines de encontrar diferencias sutiles en la neurodegeneración (ND) inducida por esta droga. Con base en lo anteriormente expuesto, el presente trabajo preliminar se propuso investigar la ND inducida por la administración crónica de alcohol en ratas con la técnica de impregnación Amino-Cupro-Argéntica, diseñada para la detección de neuronas muertas. Fueron utilizadas ratas Wistar adultas de ambos sexos, las cuales fueron administradas intragástricamente con alcohol 25% P/V durante 4 días, tres veces al día (a las 9 am, 17 pm y 01 am). La primera administración fue de 5 g/kg, en tanto que las administraciones posteriores se calcularon siguiendo la tabla de intoxicación etílica de Majchrowicz. Los principales resultados de este estudio indicaron que este esquema de administración induce un patrón de ND que afecta a estructuras como: la corteza entorrinal, el giro dentado, CA1, la corteza piriforme, el bulbo olfatorio, la corteza retrosplenial, el área amígdala-piriforme y los núcleos amigdalinos corticales. Si bien la ND vista en hembras fue equivalente a la de los machos, en éstos se encontró degeneración terminal en la corteza retrosplenial, la cual estuvo ausente en hembras. Aunque estos resultados reflejen una posible diferencia sexual en el impacto neurotóxico inducido por alcohol, serán necesarios estudios cuantitativos con un número mas grande de sujetos para corroborar dichos hallazgos. El presente reporte es el primero en demostrar ND inducida por administraciones etílicas de 5g/kg por día en un patrón de administración de tres veces por día.

354. (7096) EL HALOPERIDOL ADMINISTRADO DURANTE EL PERÍODO CRÍTICO ESTRIAL INDUCE CAMBIOS PERMANENTES DE CONDUCTA EN LA RATA. SOIZA REILLY, MARIANO; AZCURRA, JULIO MARCOS

Laboratorio de Biología Celular, Proyecto Interdisciplinario de Neuroteratología, FCEN, UBA

Un tema principal de debate en la administración de fármacos durante el desarrollo postnatal (PN), es la posible permanencia durante el resto de la vida de efectos inducidos durante los períodos críticos de maduración del desarrollo. Recientemente hemos demostrado que el ajuste permanente en la expresión de los receptores dopaminérgicos D2 (D2R) producido por la actividad motora fisiológica desarrollada en el Test de Entrenamiento Circular (TEC) durante el período crítico estriatal (edades PN30 a PN37), da carácter permanente a la reducción en la expresión de los D2R inducida por el tratamiento prenatal con haloperidol (antagonista D2R), acompañado por cambios permanentes en la conducta motora [Neurotoxicol Teratol 26: 561-569, 2004]. En este trabajo evaluamos los efectos del haloperidol administrado a dosis terapéuticas exclusivamente durante el período crítico estriatal de ajuste sináptico dependiente de actividad. Para ello se trataron ratas macho Sprague Dowley entre los días PN30 a PN37 con haloperidol (i.p. 0,7 o 2,5 mg/kg/día) o solución fisiológica (control), para luego evaluarse la actividad motora en el TEC en la adultez (PN90). Las ratas tratadas con haloperidol, mostraron una respuesta motora exacerbada en el TEC respecto al grupo control ($p < 0,01$) para ambas dosis. Concluimos entonces que la exposición a haloperidol durante el período crítico estriatal altera la conducta motora circular de manera permanente. Así, la exposición a psicofármacos durante el desarrollo postnatal tardío implicaría un riesgo de alteraciones conductuales de carácter permanente.

355. (7109) EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA Y «CRÓNICA» DEL ANTICONVULSIVANTE GABAPEN-

TINA SOBRE UNA RESPUESTA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO EN RATÓN. BLAKE, MG; BOCCIA, MM; CHELUJA, MG; SCOLARI, M; ACOSTA, GB; BARATTI, CM

Cátedra de Farmacología, FFyB, UBA; ININFA-CONICET

La gabapentina (GBP) es una droga que se utiliza en la terapia anticonvulsiva como coadyuvante. Nuestro laboratorio ha demostrado que una única administración post-entrenamiento de GBP facilita la retención de una respuesta de evitamiento inhibitorio (REI) en ratón (Acosta y col., *Neurosci. Lett.*, 279, 173-176, 2000); dicha facilitación parecería estar mediada por un efecto desinhibitorio sobre el sistema colinérgico central (Boccia y col., *Neurosci. Lett.*, 311, 153-156, 2001). En el presente trabajo se presentan evidencias que señalan una acción diferencial, tanto a nivel conductual como neuroquímico, ante una administración aguda o repetida de GBP. Se utilizaron ratones CF-1 (25-30 g) entrenados en una REI. Inmediatamente luego de finalizado el entrenamiento se administró a distintos grupos de ratones GBP por 7 días (50 mg/kg, ip, c/12 hs). Los ensayos de retención fueron realizados 12 hs, 7 días ó 14 días luego de la última administración; finalizados los mismos se determinó la actividad del transportador de colina de alta afinidad (HACU) en el hipocampo. La GBP disminuyó significativamente las latencias de retención y la HACU luego de su administración repetida durante 7 días. Sin embargo, cuando el ensayo de retención fue realizado 7 ó 14 días luego de la última administración, la retención de la REI y la HACU fueron superiores a las observadas en los grupos controles. Estos resultados sugieren que la administración repetida de GBP inhibe los mecanismos implicados en la recuperación de la información adquirida, a diferencia de lo que se observa ante una única dosis, la cual facilitaría la consolidación de dicha información. Existiría una relación entre los cambios conductuales y la actividad del sistema colinérgico central. Se señala la necesidad de efectuar estudios conductuales comparativos luego de la administración única o repetida de fármacos sobre los procesos mnemónicos, particularmente cuando aquellos revisten importancia clínico-terapéutica.

356. (7121) CONSOLIDACIÓN Y RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE UNA RESPUESTA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO EN RATÓN. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A UN AMBIENTE NOVEDOSO. BOCCIA, MM; BLAKE, MG; ACOSTA, GB; BARATTI, CM

Cátedra de Farmacología, FFyB, UBA; ININFA-CONICET

Distintos grupos de ratones macho CF-1 fueron entrenados en una tarea de evitamiento inhibitorio utilizando un choque eléctrico intenso (1.2 mA, 50 Hz., 1s); dicha condición fue elegida para reducir la influencia del fenómeno de la extinción en el desempeño de los sujetos durante las sesiones de retención (Boccia MM et al., *Neurosci.*, 124, 735-741, 2004). La exposición por 5 min a un ambiente novedoso («hole-board», conducta de hociqueo) (Boccia et al., *Acta Phys. Pharm. Therap.*, 49, 155-160, 1999), inmediatamente post-entrenamiento o luego del primer ensayo de retención (reactivación de la memoria), disminuye las latencias de retención durante 2 días consecutivos. La exposición al hole-board por 5 min, tres horas luego de finalizado el entrenamiento o el primer ensayo de retención, no afectó el desempeño de los ratones en 2 ensayos sucesivos, sugiriendo efectos tiempo-dependientes. En ratones habituados al hole-board (5 min/día, 6 días) y luego entrenados en la tarea de evitamiento inhibitorio, la re-exposición inmediata post-entrenamiento o post-reactivación de la memoria, no modificó la retención de la REI durante 2 ensayos consecutivos. Asimismo, el efecto de la exposición «aguda» al hole-board inmediatamente luego del primer ensayo de retención se observó aun luego de 21 días de finalizado el entrenamiento. La ausencia de recuperación espontánea al cabo de 21 días postentrenamiento, indican que los efectos de la exposición a un ambiente novedoso no se debería a un déficit en la recuperación de la memoria original. En conjunto los resultados descriptos sugieren que la exposición a una nueva experiencia potencialmente capaz de inducir un nuevo aprendizaje, dete-

riora no solo la consolidación sino también la reconsolidación de la memoria de una respuesta de evitamiento en ratón.

357. (7348) LA INMOVILIZACIÓN REDUCE EL ACOPLAMIENTO ENTRE LOS SITIOS DEL RECEPTOR BDZ/GABA A EN AMÍGDALA EN RESPUESTA AL APRENDIZAJE AVERSIVO. RODRÍGUEZ MANZANARES, PA; BERTOTTO, ME; ISOARDI, NA; MARTIJENA, ID; MOLINA, VA

Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

La neurotransmisión inhibitoria GABAérgica en la amígdala estaría involucrada en la modulación de respuestas emocionales generadas por exposición al estrés. Resultados previos indican que la estimulación aversiva inescapable lleva a una disminución en la transmisión GABAérgica amigdalina provocando una mayor excitabilidad neuronal y una facilitación del aprendizaje contextual de miedo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la funcionalidad de los receptores BZD/GABAa luego de una sesión de inmovilización y durante el condicionamiento aversivo. Ratas machos Wistar fueron sometidas a 30 min de inmovilización y 24 hs después expuestas a una sesión de 3 shocks eléctricos inescapables en un contexto definido. Un día después se evaluó la respuesta de congelamiento inducida por la re-exposición al contexto apareado al shock. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de la inmovilización, de la sesión de shocks o de la re-exposición al contexto apareado. Se realizó el ensayo de unión de 3H-Flunitrazepam y su modulación por GABA frío en tejido amigdalino. No se observaron cambios en el número ni en el acoplamiento entre los sitios de unión de BZD/GABAa inmediatamente después de la inmovilización. Los animales inmovilizados muestran una reducción ($p < 0,05$) en el acoplamiento funcional entre estos sitios luego del condicionamiento aversivo y de la re-exposición al contexto apareado. Los animales controles muestran un aumento significativo ($p < 0,05$) en el acoplamiento luego del condicionamiento aversivo y no se observan cambios luego de la exposición al contexto apareado al shock. La reducción en el acoplamiento entre sitios del receptor BDZ/GABAa observada en amígdala de animales inmovilizados luego del condicionamiento se asociaría a un aumento en la adquisición o consolidación de la memoria aversiva. El aumento en el acoplamiento entre sitios luego del entrenamiento se correspondería a un cambio compensatorio en respuesta al estímulo incondicionado.

358. (7374) PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR GR A CS EN SEPTUM LATERAL EN LA MODULACIÓN DE LAS SECUELAS EMOCIONALES POR CONFRONTACIÓN SOCIAL. CALFA, GASTÓN; LAPID-VOLOSIN, MARTA; MOLINA, VÍCTOR

Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

En estudios previos demostramos que la exposición a un estrés social induce conductas ansiogénicas a largo plazo y que la infusión de antagonistas para el receptor GR de CS (A-GR) en Septum Lateral (SL) antes de la experiencia de derrota previene dicha secuela. Objetivo: Conociendo que la activación del eje LHPA perdura luego de finalizado el estrés, CS a través de sus receptores en SL, área del circuito límbico que presenta conocidas acciones moduladoras sobre el miedo y la ansiedad, podría participar en las secuelas emocionales inducidas por la derrota social. Métodos: Se utilizó el modelo residente-intruso, donde ratas macho fueron canuladas bilateralmente en SL y confrontadas con un residente agresivo, 24 hs más tarde se evaluó su desempeño en un Laberinto en Cruz Elevado. Los animales derrotados denotan dos posturas de sumisión luego de amenazas y ataques por parte del animal residente: la clásica postura denominada supina (S) y la postura de inmovilidad o freezing (F). A-MR (antagonista del receptor MR de CS, ZK 91587, 10 ng/0.4ml/cánula) o A-GR (RU 38486, 10 ng/0.4ml/cánula) fueron infundidos a distintos tiempos posteriores a la confrontación (5,

60, 120 y 180 minutos). Resultados: Animales S y F mostraron una disminución en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos en relación a sus controles. Esta disminución fue selectivamente revertida solo con el tratamiento con A-GR en animales F hasta 120 min. posteriores a la derrota social, mientras que en animales S tal efecto se evidenció inclusive hasta los 180 min. La secuela emocional a largo plazo inducida por la exposición a una única sesión de estrés social fue revertida solamente por la infusión de A-GR en SL tanto en animales S como F de una manera temporalmente diferente. Se sugiere una modulación diferencial del receptor GR en SL en la adquisición de la información aversiva entre animales que expresan F o S luego de la confrontación.

359. (7568) EL ÁCIDO VALPROICO CORRIGE LA DISMINUCIÓN DE NEUROFILAMENTOS LIVIANOS EN EL HIPOCAMPO DE RATAS EXPUESTAS A UN ESTRÉS INESCAPABLE. FERRERO, ALEJANDRO; CERSETO, MARINA; SIFONIOS, LAURA; PEIXOTO, ESTANISLAO; WIKINSKI, SILVIA

ININFA-CONICET. Cátedra de Farmacología, FFyB, UBA. 1era Cátedra de Farmacología, FMedicina.

En trabajos anteriores observamos que la exposición a estrés inescapable induce una conducta de desesperanza que se correlaciona con una disminución de los neurofilamentos de 68 Kda (NF68) en diversas áreas del hipocampo. El tratamiento por 21 días con fluoxetina, si bien corrige los déficit conductuales no revierte dicha disminución. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del ácido valproico, un fármaco utilizado en el tratamiento de la depresión refractaria a los antidepresivos, sobre la presencia de NF68 en el mismo modelo de estrés inescapable. Ratas de la cepa Wistar fueron expuestas al modelo de desesperanza aprendida (60 shocks eléctricos de 0.6 mA, 15 segundos de duración, durante 1 hora). Cuatro días después se evaluaron las fallas de escape a una nueva exposición al estímulo estresante. Los animales cuya conducta resultó afectada fueron divididos en cuatro grupos: SF tratado con solución fisiológica, FLX tratado con 10 mg/kg de fluoxetina, AV tratado con 400 mg/kg de ácido valproico y FLX-AV tratado con fluoxetina y ácido valproico en las dosis antes indicadas. Todas las drogas fueron administradas durante 21 días por vía intraperitoneal. Un grupo separado no expuesto al estrés inescapable fue inyectado con solución fisiológica y utilizado como grupo control (C). Los neurofilamentos fueron medidos por inmunohistoquímica en dos áreas del hipocampo, CA3 y giro dentado. Observamos que el ácido valproico revierte la disminución de NF 68 en ambas áreas del hipocampo ($p < 0,001$) respecto de SF y FLX). La asociación FLX-AV no resultó distinta al tratamiento con AV solo. Estos resultados sugieren que los distintos mecanismos de acción del AV y la FLX podrían contribuir de distinta manera a la corrección de las alteraciones observadas en este modelo de depresión. Este trabajo se financió con: PICT 05-11102 y UBACYT FM013.

360. (7576) CAMBIOS A NIVEL DEL RECEPTOR NMDA MEDIARÍAN LA SENSIBILIZACIÓN A RESPUESTAS EMOCIONALES DE MIEDO EN ANIMALES ABSTINENTES AL ETANOL BERTOTTO, ME; BUSSOLINO, DF; BUSTOS, SG; MARTIJENA, ID; MOLINA, VA

Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, U.N.C. Córdoba, Argentina.

Estudios previos demostraron que animales en abstinencia al etanol presentan una mayor eficiencia en el aprendizaje asociativo de miedo a una clave contextual y una marcada resistencia a la extinción de esta respuesta emocional exagerada. Dado que los receptores NMDA están críticamente involucrados en la adquisición y en la extinción del miedo condicionado. Los objetivos del trabajo fueron: 1) evaluar la expresión del ARNm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA en la facilitación de las respuestas de miedo en animales abstinentes 2) evaluar el efecto de d-cicloserina (DCS, agonista parcial del

receptor NMDA) sobre el proceso de extinción de la respuesta de miedo condicionado en animales abstinentes. Ratas Wistar machos recibieron una dieta líquida con etanol (6% v/v) durante 14 días. El día 3 de abstinencia fueron sometidas a una sesión de condicionamiento (3 shocks eléctricos de 0.7mA, 3s de duración) y expuestas 24, 48, 72 y 96 hs después (durante 10 min) al contexto condicionado (CS) en ausencia del shock (entrenamiento de extinción). Luego de la primera exposición al CS un grupo de animales fue inyectado con DCS 5 mg/kg i.p. y otro grupo fue sacrificado 30 min después para evaluar la expresión del ARNm de las subunidades del receptor NMDA por hibridación in situ. La DCS facilitó el proceso de extinción únicamente en animales abstinentes ($p < 0,01$). Se observó un incremento en la expresión del RNAm de las subunidades NR2A en amígdala lateral y basolateral y NR2B en amígdala basolateral y una disminución de la subunidad NR2B en gyrus dentado en animales abstinentes ($p < 0,05$). No se observaron cambios en amígdala central y CA1. Se sugiere que la facilitación de las respuestas de miedo condicionado en animales abstinentes podría ser consecuencia de cambios a nivel del receptor NMDA inducidos por el tratamiento crónico con etanol en amígdala, estructura críticamente involucrada en la modulación de respuestas emocionales y en aprendizajes de tipo asociativo.

361. (7614) PARTICIPACIÓN DEL NÚCLEO DEL RAPE DORSAL EN ALTERACIONES CONDUCTUALES OBSERVADAS EN LA ABSTINENCIA A DIAZEPAM. ALMIRÓN, RS; RAMÍREZ, OA

Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

El Núcleo del Rafe Dorsal (NRD) es el principal centro serotoninérgico y su disfunción está relacionada con depresión y ansiedad. El hipocampo participa en el procesamiento de información y almacenamiento de memoria y presenta un tipo de plasticidad sináptica denominado Potenciación a Largo Plazo. Se demostró que neuronas serotoninérgicas regulan la comunicación hipocampo-corteza. El objetivo de este estudio fue demostrar la participación del sistema serotoninérgico en la incrementada plasticidad sináptica hipocampal observada durante la abstinencia a Diazepam (DZ). Ratas Wistar macho fueron divididas dependiendo del esquema de administración de drogas, en forma crónica, en 4 grupos: DZ (5mg/kg/día), VEH (vehículo), MK-DZ (MK-801 0.045mg/kg/día-DZ 5mg/kg/día) y MK-VEH (MK-801 0.045mg/kg/día-vehículo). Veinticuatro horas después de la última administración los animales fueron testados en un Plus Maze para medir ansiedad como signo de abstinencia a DZ. Los animales tratados con DZ fueron separados en dos grupos: dependiente (DZ-D) y no dependiente (DZ-ND) el cual se comportó como el grupo VEH. La administración de MK-801 previa a DZ, impidió el desarrollo de dependencia en el grupo MK-DZ. MK-801 no modificó la respuesta ansiogénica ya que no se observaron diferencias entre MK-VEH y VEH ($P < 0.0008$). Registros electrofisiológicos extracelulares unitarios empleados para evaluar la actividad eléctrica de NRD mostraron que el grupo DZ-D presenta un aumento en el número de células activas por tracto con respecto a DZ-ND y VEH. La administración de MK-801 impidió este aumento en el grupo MK-DZ y no se observaron diferencias entre MK-VEH y VEH ($P < 0.000001$). Los animales DZ-D mostraron un aumento en el número de neuronas serotoninérgicas cuyo firing está en un rango de 1.01 a 1.5 spike/seg con respecto a los grupos restantes ($P < 0.000005$). Este incremento en la actividad neuronal de NRD podría desinhibir la función sináptica hipocampal facilitando el fenómeno plástico que subyace la expresión conductual del síndrome de abstinencia a DZ.

362. (7726) PARTICIPACIÓN DEL CEREBELO EN EL PROCESO DE APRENDIZAJE ESPACIAL LUEGO DE LA IRRADIACIÓN IONIZANTE NEONATAL. PAGOTTO, ROMINA M.L.; DI MEGLIO, ANALUZ; ZIEHER, LUIS M.; GUELMAN, LAURA R.

1ª Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA

Tradicionalmente, los procesos de aprendizaje y memoria han sido asociados a la función hipocampal. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que también el cerebelo (CE) cumpliría un rol en el aprendizaje espacial a través de la adquisición de estrategias, contribuyendo a la memoria espacial. El objetivo de este trabajo consistió en estudiar la participación del CE en el proceso de aprendizaje espacial, memoria de trabajo (MT) y de referencia (MR). Para ello, ratas neonatas fueron irradiadas y sometidas a la prueba del laberinto radial de ocho brazos a distintas edades (40, 60 y 120 días). Se usaron dos paradigmas: el «tradicional», en el que todos los brazos fueron recompensados y «con retraso», en el que sólo cuatro brazos permanecieron recompensados en una segunda etapa, permitiendo evaluar por separado los dos tipos de memoria. Los resultados muestran que el error de MT fue mayor en animales irradiados que en los controles de todas las edades ($p < 0.05$), mientras que no se hallaron diferencias con respecto al error de MR. El tipo de estrategia utilizada se analizó a través de los ángulos de giro seleccionados para entrar a cada brazo. En los animales controles de todas las edades se observó una preferencia en la elección de ángulos de giro de 45° por sobre el resto de los ángulos. Por el contrario, en los animales irradiados, el patrón de elección del ángulo de giro varió con la edad. De la misma manera, la MT de los animales controles no varió con la edad, mientras que en los animales irradiados se observó diferencialmente alterada, apoyando la hipótesis de la utilización de una diferente estrategia en estos últimos. En conclusión, los resultados sugieren que la lesión permanente inducida por las radiaciones ionizantes sobre el cerebelo en desarrollo afectaría el proceso de aprendizaje espacial, en especial la adquisición de estrategias y su contribución a la MT, reflejando la participación del CE en dichos procesos.

363. (7835) LA HIPONUTRICIÓN PERINATAL INCREMENTA LOS EFECTOS REFORZANTES DE COCAÍNA EN RATAS ADULTAS. VALDOMERO, A.; BUSSOLINO, D.F.; ORSINGER, O.A.; CUADRA, G.R.

Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

La hiponutrición perinatal produce alteraciones permanentes en distintos sistemas neuronales, que pueden modificar la reactividad a distintos tratamientos farmacológicos. Los efectos reforzantes de cocaína están mediados por la activación de la vía dopaminérgica mesocorticolímbica y la administración repetida de cocaína induce desarrollo de sensibilización a sus efectos reforzantes. A fin de estudiar la influencia de la hiponutrición perinatal sobre la reactividad a cocaína se evaluaron: 1) propiedades reforzantes de cocaína empleando el paradigma «Conditioned Place Preference» (CPP); 2) desarrollo de sensibilización a este efecto luego de la administración repetida de cocaína; 3) mediante técnicas inmunohistoquímicas, la expresión de proteínas FosB-like en diferentes áreas cerebrales de animales sensibilizados. El efecto reforzante de distintas dosis de cocaína (3, 5, 10 ó 15 mg/kg) fue estudiado en diferentes grupos de ratas controles (C) y deprivadas (D). Los resultados obtenidos revelan interacción dieta-dosis [$F(4,89) = 6.33$, $P < 0.001$]. En animales C se observó condicionamiento a partir de la dosis de 10 mg/kg ($p < 0.05$), mientras que en ratas D la preferencia se evidenció con 5 mg/kg ($p < 0.05$). Por otra parte, el pretratamiento con cocaína (5 mg/kg/día /10 días) indujo sensibilización con las dosis de 3 y 5 mg/kg solo en animales D [$F(2,50) = 6.30$, $P < 0.01$]. Ratas D sensibilizadas y condicionadas con 5 mg/kg de cocaína mostraron un incremento significativo de proteínas FosB-like en núcleo accumbens (core y shell) y en amígdala basolateral. Los datos obtenidos demuestran que la hiponutrición perinatal incrementa los efectos reforzantes de cocaína, facilita la inducción de sensibilización y la expresión de proteínas FosB-like. Si la extrapolación al género humano fuese posible, estos resultados sugieren que sujetos con antecedentes de desnutrición infantil podrían tener una respuesta aumentada a los efectos de cocaína y/o un incremento en el «craving» durante la abstinencia a drogas de abuso.

FARMACOLOGÍA 4: TOXICOLOGÍA 1

364. (6612) ESTUDIO IN VIVO E IN VITRO DEL EFECTO DEL ALUMINIO (AL+3) SOBRE LA FORMA Y RESISTENCIA OSMÓTICA DE LOS GLÓBULOS ROJOS. CHIAROTTO, MARCELO; BAZZONI, GRACIELA B.; RASIA, MARTA L.

Facultad de Ciencias Médicas

La forma bicóncava y la resistencia osmótica (RO) de los glóbulos rojos (GR) se pueden modificar por agentes externos. En ratas intoxicadas con Al(+3) encontramos estomatocitos y aumento de la RO, que atribuimos a una interacción directa del metal con los GR. El objetivo fue confirmar dicha interacción, mediante el estudio del efecto in vitro del Al(+3) en GR humanos (GR[h]) sobre las mismas propiedades. GR[h] lavados fueron incubados en PBS sin (control) y con Al(+3) (1 y 10 mM), 30 minutos a 37°C . Se determinó para cada condición: a) $x[50]$ (concentración (cc) de NaCl donde se alcanza el 50% de hemólisis), hemólisis obtenida por el método de Dacie y b) Índice morfológico (IM) según Bessis, utilizando microscopía. Estadística: test de Wilcoxon (grupos apareados) Mediana e intervalo de confianza (95%) Significado: a,b $p < 0.01$; c $p < 0.001$.

	n:10	x[50] (mM)	IM
GR[h]control	68,47(a)(67,76-72,67)		-0,65(a)(-1,07/-0,30)
GR[h]+1 μM Al(+3)	78,37(a,b)(66,57-79,20)		-1,7(a,b)(-2,24/-0,60)
GR[h]+10 μM Al(+3)	70,61(b)(67,00-72,41)		-2,43(a,b)(-3,06/-1,88)
n:7			
ratas control	81,07(c)(80,80-82,80)		-0,9(c)(-1,1/-0,7)
ratas con Al(+3)	68,25(c)(67,70-69,40)		-2,60(c)(-2,90/-2,40)

La respuesta al Al(+3) tienen igual sentido in vivo e in vitro. En esta última condición, el grado de estomatocitosis dependió de la cc y la RO se modificó en forma bifásica. Estos resultados confirman nuestra hipótesis, avalando la teoría de que pocos iones Al(+3) desorganizan la bicapa lipídica pero al aumentar, interaccionan con nuevos grupos polares de la capa externa de la membrana, la encogen y favorecen un rearrreglo cooperativo de las moléculas lipídicas.

365. (6634) EFECTO IN VIVO E IN VITRO DEL ALUMINIO (AL+3) SOBRE LAS PROPIEDADES DE FLUJO DE LOS GLÓBULOS ROJOS. BOLLINI, ADRIANA N; HERNÁNDEZ, GLADIS, N; BAZZONI, GRACIELA B; RASIA, MARTA L

Facultad Ciencias Médicas

La intoxicación con Al(+3) produce anemia, pero poco se sabe del efecto sobre la hemorreología. Anteriormente comprobamos deterioro de deformabilidad (DE) y agregabilidad eritrocitaria (AE) en ratas intoxicadas. Estos efectos podrían deberse a la acción directa sobre los GRs y/o al deterioro metabólico del animal in toto. El objetivo fue investigar la posible acción directa del metal sobre la membrana celular mediante el estudio del efecto in vitro del Al(+3) en GRs humanos (GR[h]) y su comparación con lo observado en los animales in vivo. GR[h] lavados fueron incubados en solución salina bufferada PBS sin (control) y con Al(+3) 1 mM (30 minutos a 37°C) (n:10). Se midió: a) viscosidad (v) de la suspensión y del medio con viscosímetro cono-plato, calculándose v relativa (vr); b) índice de rigidez (IR) por filtración y c) AE en Dextrán 500 al 2%, método óptico que determina: $2k[2]n[0]$ (velocidad inicial) y $s[0]/n[0]$ (tamaño de los agregados) Estadística: test de Wilcoxon (grupos apareados) Mediana e intervalo de confianza (95%) Significado: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

	vr	IR (%)	$2k[2]n[0]$	$s[0]/n[0]$
GR[h]control	2,6(2,5-2,9)	8,7(6,2-9,3)	1,0(0,8-1,1)	1,86(1,84-1,87)
GR[h]+1 μM Al(+3)	2,9(**)(2,6-3,4)	13,8(**)(12,2-16,8)	0,7(***)(0,6-0,8)	1,83(***)(1,81-1,84)
Ratas controles	4,1(3,8-4,4)	9,1(8,2-10,4)	0,6(0,5-0,7)	1,74(1,72-1,79)
Ratas + Al(+3)	4,4(**)(4,0-4,6)	>20(***)	0,5(***)(0,4-0,6)	1,68(**)(1,62-1,75)

Los resultados muestran que el Al(+3) in vitro provoca en GRs humanos deterioro de la DE (medida por viscosimetría y por filtración) y AE, similar al observado en animales intoxicados. Este

estudio aporta datos a favor de la hipótesis de la acción directa del ion sobre la membrana de la célula roja: alterando las propiedades de flujo y consecuentemente la reducción de su vida media.

366. (6889) EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL TRANSPORTE INTESTINAL DE CALCIO EN RATAS DURANTE LA PREÑEZ Y LACTANCIA. ORIHUELA, DANIEL; PIZARRO, MANUEL; DURSO, NICOLÁS

Lab. Invest. Fisiol. Exp., Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe

Desde la segunda mitad de la preñez y durante la lactancia ocurre un aumento adaptativo del transporte de calcio (Ca) en el intestino, mediado parcialmente por prolactina (PRL) en conjunción con otros factores, que permite al esqueleto materno acumular Ca para hacer frente al posterior pico de demanda fetal. Los efectos tóxicos del aluminio (Al) sobre el metabolismo del Ca podrían resultar particularmente perniciosos en esta etapa. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de una sobrecarga oral de Al sobre la absorción de Ca intestinal en ratas preñadas (PZ) y en lactancia (LA). Ratas Wistar hembras adultas fueron tratadas desde el día 1 de PZ con 0 (C), 60 o 120 mg AlCl₃/kg/día o.g. La mitad de los animales en cada grupo recibieron 5 mg/kg o.g. de bromocriptina (BrC, inhibidor de la secreción de PRL), 24 hs antes de la medición de la absorción intestinal de Ca. Entre 24-72 hs antes del parto y a los 7 días de lactancia, se determinó el transporte de Ca en sacos evertidos de duodeno-yeyuno in vitro utilizando ⁴⁵Ca como marcador de flujo (JCams). Tanto en PZ como en LA el Al produjo una reducción del JCams que fue dependiente de la dosis de Al administrada, siendo más marcada la inhibición en PZ (PZ: C=4,53 ± 1,65; Al 60=2,21 ± 0,10*; Al 120=1,98 ± 0,36* umol Ca/h/g tej.húm. LA: C=3,41 ± 1,26; Al 60=2,42 ± 0,48; Al 120=1,79 ± 0,30* umol Ca/h/g tej.húm, *P<0,05 vs. C respectivo). El tratamiento con BrC disminuyó el porcentaje de inhibición del Al sobre JCams en mayor proporción en LA (Al 120: sin BrC=46 ± 4%; con BrC=21 ± 2%) que en PZ (Al 120: sin BrC=56 ± 4%; con BrC=41 ± 2%). Se puede concluir que el Al reduce la absorción de Ca por la vía transcelular en el intestino delgado de la rata en PZ y LA, disminuyendo la disponibilidad de Ca para producir la mineralización ósea del feto. La inhibición podría ocurrir en parte por interferencia con los mecanismos fisiológicos de transporte de Ca mediados por el incremento de los niveles de PRL durante la etapa final de la preñez y especialmente en la lactancia.

367. (7102) INTERACCIONES DEL TALIO (I) Y TALIO (III) CON MOLÉCULAS OXIDANTES: CONSECUENCIAS SOBRE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA. VILLAVERDE, MARCELA; VERSTRAETEN, SANDRA

Depto. Química Biológica, IQUIFIB (UBA-CONICET), Fac. Farm. y Bioquímica, Univ. Buenos Aires

El talio (Tl) es un metal pesado que posee dos estados de oxidación (Tl(+) y Tl(3+)). El Tl(3+) forma en agua el hidróxido correspondiente (Tl(OH)[3]) el cual al ser poco soluble en medio acuoso, tiene una baja biodisponibilidad. Tanto en modelos animales como en seres humanos intoxicados con Tl se observó neurodegeneración y desmielinización. Dado que la acumulación de Tl(+) en el cerebro de ratas se correlacionó con un mayor contenido de productos de oxidación lipídica, en el presente trabajo investigamos in vitro la capacidad del Tl de oxidar per se a los fosfolípidos y/o de estimular el daño oxidativo mediado por ciertos oxidantes. Para ello se incubaron liposomas de fosfatidilcolina y fosfatidilserina en una relación molar 60:40 que contenían la sonda C[11]-BODIPY (2 mol %) durante 2 hs a 37 (o)C en presencia de Tl(+), Tl(3+) o Tl(OH)[3] (1-25 µM). Los resultados obtenidos mostraron que solamente el Tl(OH)[3], oxidada per se a los fosfolípidos. Para evaluar la posible interacción del Tl con moléculas oxidantes, se incubaron los liposomas en presencia de Tl(+), Tl(3+) o Tl(OH)[3] (1-25 µM) y la oxidación lipídica se inició por el agregado de 2 mM H[2]O[2], 5 µM Fe(2+), 1 mM

del azo-compuesto AAPH o 2 µM rosa de bengala (RB). El Tl(3+) estimuló la oxidación lipídica mediada por RB y AAPH, e inhibió la oxidación por Fe(2+) y H[2]O[2]. El Tl(+) y Tl(OH)[3] no alteraron el efecto de los oxidantes estudiados. Los resultados sugieren que tanto por oxidación directa de los lípidos (Tl(OH)[3]) como por la interacción con otros oxidantes (Tl(3+)) este metal puede causar oxidación lipídica. Por otro lado, el Tl(+) no tuvo un efecto directo o indirecto sobre la oxidación lipídica, sugiriendo que en el estrés oxidativo asociado a la intoxicación con Tl(+) estarían involucrados otros mecanismos. Proyecto subsidiado por la Universidad de Buenos Aires (B405 y B072) y la ANPCyT (PICT 12285).

368. (7138) PARTICIPACIÓN DE LAS CABEZAS POLARES DE LOS LÍPIDOS EN LA INTERACCIÓN DEL BORO CON LAS MEMBRANAS. VERSTRAETEN, SANDRA V.; LANOUE, LOUISE; KEEN, CARL L.; OTEIZA, PATRICIA I.

Depto. de Química Biológica, IQUIFIB (UBA-CONICET), Fac. Farmacia y Bioquímica, Univ. Buenos Aires; Depto. Nutrición y Toxicología Ambiental, Univ. California, Davis, USA.

El boro (B) es un metal esencial cuya deficiencia causa profundas alteraciones metabólicas e induce teratogenia. Utilizando liposomas de fosfatidil colina (FC) y mezclas binarias de FC y fosfatidil serina (FS), galactolípidos (GL), fosfatidil inositol (FI) o cardioplipina (CL) se investigaron los efectos del B (10-1000 µM) sobre: a) el potencial superficial de membrana, b) la separación lateral de fases, c) la fluidez de la membrana, y d) la hidratación de las cabezas polares de los lípidos. Encontramos que el B (10-1000 µM) aumentó el potencial superficial en los liposomas de FC, FC:FS, FC:GL y FC:FI. El B causó separación de fases sólo en los liposomas de FC. También en liposomas de FC, el B afectó la fluidez de la membrana en la interfase líquido-agua sin afectar la fluidez de la porción hidrofóbica de la bicapa. En las demás poblaciones de liposomas, el B aumentó la fluidez de membrana tanto en la región hidrofóbica como en los dominios aniónicos, efecto que se correlacionó con la disminución de la fluidez en los dominios catiónicos. Finalmente, el B disminuyó la hidratación de las cabezas polares de los lípidos independientemente de la composición de los liposomas. Los resultados demuestran que el B interactúa con las membranas, alterando las propiedades físicas de las mismas. Estas interacciones varían según la composición de la bicapa, siendo mayor cuando los lípidos contienen cabezas polares polihidroxiladas, como los GL y el FI. Estas interacciones diferenciales podrían ser relevantes en la modulación de ciertos procesos asociados a la membrana. Proyecto subsidiado por la Univ. Buenos Aires (B054) y el CONICET (PIP 02120).

369. (7756) ESTUDIO DE LA TOXICIDAD PRODUCIDA POR EL ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) SOBRE CÉLULAS EN CULTIVO. CHOLICH, V; BLASINA, F(1); COSTA, G(1); ARREDONDO, F(1); DAJAS, F(1); DUFFARD, R; EVANGELISTA, AM

Laboratorio de Toxicología Experimental (LATOEX). Fac de Cs Bioqcas y Farmacéuticas. Rosario. Arg.; (1)Lab. de Neuroqca. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Uruguay

El 2,4-D es un herbicida utilizado mundialmente. Muchos estudios han indicado que el SNC es blanco importante para el desarrollo de sus efectos tóxicos. Como las células de feocromocitoma de rata (PC12) son una línea celular clonal dopaminérgica que muestran numerosas características de neuronas simpáticas, constituyen un excelente modelo celular para evaluar mecanística de citotoxicidad y neurotoxicidad de varios marcadores neuroquímicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos citotóxicos y de liberación monoaminérgica por el 2,4-D en células cultivadas y su interacción con Anfetamina (Anf), tanto en la clona salvaje como sobre las células de tipo neuronal inducidas por NGF. Estas células cultivadas en medio RPMI 1640 fueron expuestas al inicio del cultivo a diferentes

concentraciones de 2,4-D (3; 1 o 10-3 mM) o Anf (1000; 100 o 1mM) o sus combinaciones, durante 48 y 72hs. También se utilizaron células PC12 inducidas por NGF (100 µg/ml) tratadas con 2,4-D (3; 1 o 10-3mM) y/o Anf (100 mM) durante 7 días. Se evaluaron los efectos sobre viabilidad celular a través del método del MTT-Thiazoyl blue y la liberación de monoaminas por HPLC-EC previo estímulo con la solución de Krebs Ringer. Sólo 2,4-D (3mM) disminuyó la viabilidad celular en un 65% con respecto a los controles de 48 y 72hs, como así también, en los cultivos con NGF. Anf no alteró la viabilidad. 2,4-D (3mM) y Anf (1000; 100 o 1mM) disminuyeron la viabilidad entre un 60 y 70%. Anf (100mM) 24hs posteriores al agregado de 2,4-D (3mM) no modificó la viabilidad con respecto al tratamiento conjunto de ambas drogas o 2,4-D (3mM). Por lo tanto, el tiempo de exposición estaría afectando el efecto del herbicida sobre la viabilidad celular. Como así tampoco, 2,4-D afectaría la diferenciación celular. El ácido homovanílico fue el metabolito más liberado al medio, encontrándose poco contenido de noradrenalina y ácido 3,4-dihidroxifenilacético en el interior de las células y en el medio basal.

370. (7943) ESTRES OXIDATIVO EN CULTIVO NEURONAL INDUCIDO POR EL ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) Y ANFETAMINA COMO PROTECTOR CELULAR. BONGIOVANNI, BETTINA; KONJUH, CINTIA; FERRI, ALEJANDRO; RASSETTO, MAURICIO; E DE DUFFARD, ANA MARIA; DUFFARD, RICARDO

Laboratorio de Toxicología Experimental (LATOEX) Facultad de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR

El ácido 2,4-D es uno de los herbicidas más utilizados en agricultura, la exposición al mismo produce distintos efectos adversos sobre diferentes especies animales entre ellos el ser humano, por ejemplo neurotoxicidad. En trabajos previos del LATOEX se demostró que en cultivos de células granulares de cerebelo (CGC) expuestos a 2,4-D se induce apoptosis neuronal, por un mecanismo aún no dilucidado, pero que podría involucrar un desbalance en los niveles de especies oxidantes, además se ha descrito que el agregado de bajas dosis de Anfetamina en los mismos cultivos disminuye la mortandad celular inducida por el 2,4-D. Los objetivos del presente trabajo consistieron en determinar a) si la muerte celular inducida por el 2,4-D involucra un incremento en el estrés oxidativo y b) si la Anfetamina protege actuando sobre el estado oxidativo celular. Se utilizaron cultivos de CGC expuestos a 2,4-D (1mM) y/o Anfetamina (1 y 10 mM) durante 24 y 48 hs, determinándose el porcentaje de viabilidad celular (% VC), nivel de especies reactivas del oxígeno (EROs), las actividades enzimáticas de Catalasa (CAT) y Superóxido dismutasas Mn- y Cu/Zn- (SOD) y la producción de Oxido Nítrico (NO). Se determinó un incremento en los niveles de EROs (105,1%; 81,1%) y una disminución de la actividad de la CAT (29,0%, 58,7%) por efecto del 2,4-D, a las 24 y 48 hs (respectivamente) de exposición. El agregado de Anfetamina en las dos concentraciones estudiadas revirtió los efectos inducidos por el herbicida, tanto en lo referido a los niveles de EROs como en la actividad de CAT, manteniendo los valores de los cultivos controles. No se observaron variaciones en la actividad de SODs, ni en el nivel de NO. En conclusión, los resultados indicarían que el 2,4-D induce un incremento en el estrés oxidativo, el cual puede ser revertido por bajas dosis de Anfetamina, sugiriendo un mecanismo de protección contra la neurotoxicidad producida por el herbicida

371. (7963) EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA SOBRE EL ESTRES OXIDATIVO INDUCIDO POR EL ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) EN CULTIVO NEURONAL. BONGIOVANNI, BETTINA; FERRI, ALEJANDRO; RASSETTO, MAURICIO; E. DE DUFFARD, ANA MARIA; CARDINALLI, DANIEL (2); DUFFARD, RICARDO

Laboratorio de Toxicología Experimental (LATOEX) Facultad de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR; Departamento de Fisiología Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

El herbicida ácido 2,4-D, en sus distintas formulaciones, es uno de los 5 más utilizados para controlar las malezas en el mundo. La exposición a este compuesto provoca diversos efectos adversos en humanos y animales, entre ellos embriotoxicidad, teratogenicidad y neurotoxicidad. En trabajos previos del LATOEX se demostró que el 2,4-D induce apoptosis en cultivo de células granulares de cerebelo (CGC), estas neuronas glutamatérgicas expresan todos los subtipos de receptores a ese aminoácido siendo sus cultivos utilizados como modelo experimental en el estudio de drogas excitotóxicas. Recientemente, se demostró que la toxicidad del 2,4-D en CGC involucra un mecanismo de estrés oxidativo; además se conoce que la melatonina puede ser protector (eliminando especies oxidantes) de los efectos adversos inducidos por el Ácido Káinico sobre los receptores no-NMDA. En este trabajo se ha propuesto como objetivo estudiar la posible capacidad de la melatonina de proteger de la toxicidad provocada por el herbicida. Se utilizaron cultivos de CGC expuestos a 2,4-D (1mM) y/o Melatonina (0.1 y 0.5 mM) por 48 hs, determinándose el porcentaje de viabilidad celular (% VC), nivel de especies reactivas del oxígeno (EROs) y las actividades enzimáticas de Catalasa (CAT) y Superóxido dismutasas Mn- y Cu/Zn- (SOD). En los cultivos de CGC tratados con Melatonina (0,1 mM) y 2,4-D se determinó una disminución en la muerte celular (86,6 ± 1,6% VC) comparando con cultivos controles expuestos sólo a 2,4-D (71,8 ± 0,9% VC) una disminución de los niveles de EROs (35,2%) y un incremento en las actividades de CAT (85,2%). No se observaron diferencias significativas en las SODs con respecto al control. Los resultados sugerirían que la melatonina tendría una acción protectora contra los efectos adversos inducidos por el 2,4-D, probablemente disminuyendo el estrés oxidativo.

372. (8099) AGENTES BLOQUEANTES DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE VENENO BOTRÓPICO. POTENCIAL USO FARMACOLÓGICO EN EL TRATAMIENTO COMPLEMENTARIO DE LA INTOXICACIÓN OFÍDICA. GAY, CLAUDIA CAROLINA (1); MARUÑAK, SILVANA (2); RUIZ, RAQUEL (2); LEIVA, LAURA (1); ACOSTA, OFELIA (2)

(1) *FacENA, UNNE, Av. Libertad 5400, (3400) Corrientes;*
(2) *Fac. de Cs Veterinarias, UNNE, Sgto Cabral 2139 (3400) Corrientes*

El veneno de ofidios del género Bothrops induce daños sistémicos, y provoca severos efectos locales debido a la presencia de enzimas que por acción individual ó sinérgica desencadenan la intoxicación, siendo las metaloproteasas las principales responsables de la acción fisiopatológica del veneno. Así, estas enzimas son blanco de búsqueda de nuevos inhibidores para el tratamiento de la intoxicación, complementario al suero antiofídico, el cual, si bien es efectivo para la neutralización de daños sistémicos, los locales lo son sólo parcialmente, especialmente la hemorragia. En el presente trabajo se estudió el efecto de quelantes de metales sobre la actividad proteolítica del veneno de Bothrops alternatus. Dado que la hemorragia es consecuencia de la proteólisis de la pared vascular, también se estudió la inhibición de la actividad hemorrágica in vivo. La inhibición de la actividad proteolítica se estudió mediante detección de hidrólisis de caseína y de fibrinógeno por electroforesis sobre gel de poliacrilamida. Se ensayaron los siguientes quelantes de metales: alizarina, arsenazo III y calcio. Se incubaron en partes iguales, volúmenes de solución de quelante y de veneno, luego, alícuotas de la mezcla fueron incubadas con solución de caseína ó de fibrinógeno, posteriormente desnaturalizadas y sometidas a SDS-PAGE. La inhibición de la actividad hemorrágica se llevó a cabo según método, en piel, de Kondo. Veneno preincubado con cada quelante fue inyectado i.d. en ratones, los que fueron sacrificados 2 horas después, midiéndose el diámetro de las áreas hemorrágicas. Alizarina y arsenazo III inhibieron totalmente la actividad proteolítica y hemorrágica del veneno, mientras que calcio sólo parcialmente. Alizarina y arsenazo III poseen capacidad de inhibir metaloproteasas del veneno botrópico.

Tales evidencias los vuelve potenciales fármacos para el tratamiento local de la intoxicación ofídica.

GASTROENTEROLOGÍA, METABOLISMO Y NUTRICIÓN 1

373. (7023) FOSFATIDILINOSITOL-3-KINASA (PI3K) MEDIA EL TRÁFICO DE AQUAPORINA-8 (AQP8) HACIA LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL HEPATOCITO INDUCIDO POR GLUCAGON. GRADILONE, SERGIO; CARRE-RAS, FLAVIA; LEHMANN, GUILLERMO; MARINELLI, RAÚL

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET)

PI3K media diversas vías de transducción de señales en los hepatocitos, incluidas algunas involucradas en la regulación del tráfico vesicular y en el proceso de secreción biliar. Los hepatocitos expresan el canal de agua AQP8, predominantemente en una localización intracelular. La hormona glucagon, induce la redistribución de AQP8 hacia la membrana canalicular por un mecanismo dependiente de AMPc/PKA. Glucagon también estimula la actividad PI3K e interacciones entre AMPc y PI3K han sido descritas en hepatocitos. Por lo tanto, nuestro objetivo fue analizar si PI3K interviene en la regulación de la translocación de AQP8 inducida por glucagon en hepatocitos. Hepatocitos aislados de rata se incubaron a 37 (o)C durante 20 min. en presencia de los inhibidores específicos de PI3K, wortmannin (100 nM) o LY294002 (20 µM) y posteriormente durante 10 min. en presencia o ausencia de glucagon (1 µM). Se prepararon membranas plasmáticas por centrifugación en gradiente de densidad y se analizó AQP8 por inmunoblotting. El aumento de AQP8 en la membrana plasmática inducido por glucagon (+97%; $p < 0,01$ $n=3$), fue totalmente inhibido en las células preincubadas con wortmannin o LY294002. Estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal confirmaron estos resultados. El análisis funcional mostró que el aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática al agua inducida por glucagon (+85%; $p < 0,05$ $n=3$), fue bloqueado por los inhibidores de PI3K. En conclusión, nuestros resultados indican que la translocación de AQP8 hacia la membrana plasmática del hepatocito regulada por glucagon requiere la activación de PI3K como señal intracelular.

374. (7024) LA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE HEPATOMA DE RATA, WIF-B, EXPRESA LOS TRANSPORTADORES INVOLUCRADOS EN LA SECRECIÓN BILIAR. GRADILONE, SERGIO (1); TIETZ, PAMELA (2); SPLINTER, PATRICK (2); MARINELLI, RAÚL (1); LARUSSO, NICHOLAS (2)

(1) *Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET)*;
(2) *Center for Basic Research in Digestive Diseases, Mayo Clinic, USA*

La línea celular WIF-B deriva de hepatoma de rata y fibroblastos humanos. Estas células son capaces de formar vacuolas canaliculares entre células adyacentes, dentro de las cuales pueden ser secretadas sustancias colefílicas. Estas características, convierten a esta línea celular en un excelente modelo polarizado para el estudio in vitro del tráfico vesicular y la generación de la bilis canalicular. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de aquaporinas (AQPs) y de los principales transportadores de solutos involucrados en la formación de la bilis canalicular. A partir de cultivos confluentes (10 días) de células WIF-B, se realizó la purificación del ARN mensajero y se prepararon además fracciones subcelulares enriquecidas en membranas plasmáticas e intracelulares. La expresión de los genes de rata para aqp0, aqp8, aqp9, mrp2 (proteína asociada a resistencia a multidroga 2), bsep (bomba exportadora de sales biliares) y ae2 (intercambiador Cl⁻/HCO₃⁻) fue demostrada por RT-PCR, seguido de la secuenciación de los fragmentos amplificados. La presencia a nivel proteína fue confirmada por inmunoblotting. Mediante inmunofluorescencia y micros-

copía confocal se observó que AQP0 presenta una distribución netamente intracelular, mientras que AQP9 se ubica en la membrana basolateral. AQP8, el canal de agua hepático involucrado en la secreción biliar canalicular, presentó una localización intracelular pericanalicular. Los transportadores de solutos Mrp2, Bsep y AE2 también mostraron una localización pericanalicular, observándose una marcada colocalización con AQP8. En conclusión, nuestros resultados indican que las células WIF-B expresan los transportadores directamente involucrados en la generación de la secreción biliar canalicular, lo cual permitirá futuros estudios de regulación del tráfico y expresión de los mismos.

375. (7053) POLARIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL EN ESFEROIDES DE HEPATOCITOS PORCINOS. LORENTI, ALICIA; BARBICH, MARIANA; HIDALGO, ALEJANDRA; IELPI, MARCELO; IZAGUIRRE, FERNANDA; CASCO, VÍCTOR; ARGIBAY, PABLO

ICBME Hospital Italiano Buenos Aires; Ftad Bioingeniería, Univ Nacional Entre Ríos, Paraná

El cultivo de células hepáticas como esferoides parece ser el enfoque más apropiado para obtener in vitro un nivel de organización similar al hallado en el tejido hepático. El objetivo de este trabajo fue el análisis de esferoides de células porcinas cultivados 48 hs, mediante microscopía óptica y electrónica. Fueron halladas fibras de colágeno y una red de fibras reticulares. Fue demostrada la presencia de células epiteliales biliares (Citokeratina 19 +), formando estructuras tipo ducto biliar. Mediante tinciones con lectinas, se identificaron células positivas para WGA y SNA, indicando la presencia de lactosamina y ácido siálico terminales sobre la superficie de los esferoides. Se hallaron moléculas de adhesión (β y γ -cateninas y panchaderinas) en diferentes regiones de los esferoides, especialmente en las capas externas, con características de epitelio cuboidal. La observación por microscopía electrónica mostró que los esferoides formaban estructuras muy compactas, de superficie lisa y poros de excreción, presencia de canalículos biliares con microvelosidades, y uniones íntimas, del tipo de uniones tight, zonula adherens y desmosomas. Usando un análogo de sal biliar fluorescente se identificó una compleja red de canalículos biliares dentro de los esferoides. La polaridad estructural y funcional de las células hepáticas es fundamental para diversas aplicaciones, como el desarrollo de un hígado bioartificial. En este sentido, los resultados presentados muestran que el cultivo de esferoides ofrece un modelo adecuado, en cuanto permite el desarrollo in vitro de una arquitectura de tipo tisular.

376. (7083) AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICRODOMINIOS LIPÍDICOS (RAFTS) EN MEMBRANA PLASMÁTICA APICAL Y BASOLATERAL DEL HEPATOCITO. TIETZ, PAMELA; MAZZONE, AMELIA; JEFFERSON, JOHN; LARUSSO, NICHOLAS

Department of Basic Research in Digestive Disease, Mayo Medical School, Rochester, MN, EE.UU.

La secreción biliar canalicular resulta de la acción coordinada de transportadores de solutos y de agua (aquaporinas) localizados en la membrana basolateral (BL) y apical (AP) del hepatocito. Microdominios lipídicos (rafts) de membrana podrían estar involucrados en la inserción exocítica y activación de esos transportadores. Nuestro objetivo fue la identificación de rafts en la membrana plasmática BL y AP del hepatocito. METODOLOGÍA. Se prepararon membranas plasmáticas BL y AP de hepatocitos de rata. Seguidamente, utilizando centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, se aislaron subfracciones solubles e insolubles (rafts) en el detergente Tritón. Se usaron marcadores positivos (fosfatasa alcalina y Na/K ATPasa) y negativos (aminopeptidasa-N) para rafts. Las proteínas Caveolina-1 (asociada a rafts), clathrina (ausente en rafts) y toxina cólica B (que une el esfingolípido de rafts GM1), se determinaron por inmunoblotting. La composición lipídica se determinó por

cromatografía. RESULTADOS: Las fracciones insolubles en Tritón (rafts), se encontraron en la interface 5/30% del gradiente. Ambas fracciones mostraron: a) enriquecimiento en colesterol y fosfolípidos; b) enriquecimiento en fosfatasa alcalina y Na/K ATPasa y ausencia de aminopeptidasa-N; c) presencia de caveolina-1 y ausencia de clatrina; d) enriquecimiento en toxina colérica B. Inmunofluorescencia confocal en duplas de hepatocitos mostró a caveolina-1 y a la toxina colérica B, localizadas en microdominios de membrana plasmática BL y AP. CONCLUSIONES: El hepatocito contiene microdominios (rafts) enriquecidos en colesterol y fosfolípidos en sus membrana plasmáticas BL y AP. El aislamiento de estos rafts permitirá futuros estudios de localización y tráfico de transportadores determinantes de la secreción biliar canalicular.

377. (7128) EFECTO PROTECTOR DE LA BILIRRUBINA NO CONJUGADA (BNC) SOBRE LA LISIS HEPATOCELULAR MEDIADA POR COMPLEMENTO (C). BASIGLIO, CECILIA (1,2); ARRIAGA, SANDRA (2); PELUSA, FABIÁN (2); ALMARÁ, ADRIANA (2,3); ROMA, MARCELO (1); MOTTINO, ALDO (1)

IFISE-CONICET; Área Bioquímica Clínica (3) CIUNR. Fac. de Cs. Bioquímicas y Farm. UNR.

Previamente demostramos que la BNC inhibe la actividad hemolítica del C por la vía clásica. El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del pigmento sobre la lisis hepatocelular inducida por anticuerpos (Ac) y mediada por C. Se obtuvo un Ac policlonal por inoculación de conejos con membranas plasmáticas de hepatocitos de rata. Posteriormente, se aislaron hepatocitos de rata y se incubaron con Ac y C (suero de rata fresco), en ausencia y presencia de distintas concentraciones de BNC. La lisis hepatocelular se evaluó midiendo la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes por método cinético. Los % de inhibición en la liberación de LDH obtenidos para BNC 2,5; 5; 10 y 20 mg/dl (n=3) fueron respectivamente: 11±7; 17±15; 52±21* y 95±5*; (* p< 0,05 vs. control (sin BNC). El efecto del pigmento sobre la acción del C también se evaluó a través de la comprobación del depósito de C3 sobre la membrana de las células hepáticas por inmunofluorescencia indirecta. Se utilizaron como sustrato improntas de hepatocitos de rata, las cuales se incubaron con Ac y C, en ausencia y presencia de BNC (20 mg/dl). El C3 unido se evidenció con un anti-C3 de rata conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Mientras que, en ausencia de BNC, se observó depósito fluorescente de anti-C3-FITC en la membrana, la fluorescencia fue negativa en presencia de BNC. Los resultados indican que BNC inhibe la lisis hepatocelular mediada por C en forma dosis dependiente y sugieren que este efecto se ejercería sobre la unidad de reconocimiento y/o de activación de la vía clásica del C. El conocimiento de los mecanismos que modulan negativamente la acción del C podría contribuir al diseño de estrategias terapéuticas conducentes a mitigar los efectos inflamatorios en enfermedades que cursan con activación del C y afectan la integridad del hepatocito.

378. (7150) LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN CELULAR DEL CANAL DE AGUA AQUAPORINA-9 (AQP9) ESTÁN ALTERADAS EN COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA. CALAMITA, GIUSEPPE(1); FERRI, DOMENICO(1); GENA, PATRIZIA(1); CARRERAS, FLAVIA(2); LIQUORI, GIUSEPPA(1); MAZZONE, AMELIA(1); TIETZ, PAMELA(3); LARUSSO, NICHOLAS(3); MARINELLI, RAUL(2); SVELTO, MARIA(1)

Universidad de Bari, Italia (1); IFISE-CONICET. UNR (2), Mayo Medical School, USA (3).

Las aquaporinas AQP8 y AQP9 cumplirían un rol central en la formación de la bilis canalicular. La AQP9, localizada en la membrana basolateral del hepatocito, facilita el ingreso osmótico de agua, mientras que la AQP8 su secreción canalicular. Re-

cientemente observamos que en disfunción secretora biliar asociada a colestasis obstructiva, la expresión hepática de AQP8 está significativamente disminuida. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión génica y la localización celular de AQP9 en hígado de ratas con colestasis obstructiva causada por 1, 3 y 7 días de ligadura del conducto biliar (BDL). Resultados: El ARNm de AQP9, medido por RT-PCR semi-cuantitativa, se encontró disminuido un 35% (p< 0,05) a los 7 días de BDL. Estudios de fraccionamiento subcelular seguido de inmunoblotting indicaron que a los 7 días de BDL, el contenido de AQP9 en la membrana plasmática se redujo significativamente (85%, p< 0,05). Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de secciones de hígado confirmaron estos resultados. Además, permitieron observar una acumulación intracelular de AQP9 a partir de 1 día de BDL, sugiriendo una alteración de su tráfico a la membrana basolateral. Conclusión: la colestasis obstructiva extrahepática produjo una disminución de la expresión de AQP9 en hepatocitos, tanto a nivel proteínico como del ARNm, como así también una progresiva deslocalización subcelular. La expresión y localización defectuosa de AQP9 podría estar involucradas en los mecanismos moleculares determinantes de la disfunción secretora biliar en colestasis.

379. (7316) ROL DEL ESTRÉS OXIDATIVO OCASIONADO POR EL ALUMINIO EN LA FUNCIÓN TRANSPORTADORA HEPÁTICA. EFECTOS DE LA VITAMINA E. GONZÁLEZ, MARCELA AIDA; ROMA, MARCELO(1); ÁLVAREZ, LUJÁN(1); BERNAL, CLAUDIO; MAHIEU, STELLA; CONTINI, MARÍA DEL CARMEN; CARRILLO, MARÍA CRISTINA(1)

Fisiología Humana. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral; (1) Instituto de Fisiología Experimental. CONICET. Universidad Nacional de Rosario

Demostramos que la administración crónica de aluminio (Al) disminuye la excreción canalicular de aniones orgánicos colefilicos, por inhibición parcial de la expresión y actividad transportadora de Mrp2. Dado que Al ocasionó también un aumento de la lipoperoxidación (LPO), con disminución de glutatión (GSH) y de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), analizamos el posible rol del estrés oxidativo en las alteraciones de Mrp2 inducidas por Al. Ratas Wistar machos adultos fueron divididas en los siguientes 4 grupos experimentales (n=5 c/u): A: control; B: +Al (27 mg/kg pc, ip, 3 por semana, durante 3 meses); C: +Vit E (600 mg/kg, sc, idem a +Al); D: Vit E+Al. Se estudió la excreción biliar del sustrato de Mrp2 dinitrofenil-S-glutatión (DNFG) (por espectrofotometría) y los niveles de Mrp2 en membranas plasmáticas totales (por «Western blotting»). +Al presentó una reducción de la excreción acumulativa de DNFG (de 629 ± 21 a 268 ± 25 nmol/h/100g pc, p<0.05), la cual se vio normalizada en el grupo Vit E+Al (615 ± 1 2). Coincidentemente, Mrp2 fue disminuida un 50 ± 6% por Al (p<0.05 vs control), siendo esta disminución totalmente contrarrestada por la co-administración de Vit E. Tales cambios se asociaron con un aumento en el grupo +Al de LPO (de 275 ± 38 a 573 ± 75 nmol MDA/g tej. húm., p<0.05) y una reducción en los niveles de GSH (-30 ± 4%, p<0.05) y de las actividades CAT (-80 ± 7%, p<0.05) y GSH-Px (-42 ± 6%, p<0.05). GSH y la actividad GSH-Px se vieron totalmente normalizadas en Vit E+Al, mientras que CAT vio parcialmente, aunque significativamente recuperada su actividad (+62 ± 5% vs. +Al, p<0.05). Concluimos que el estrés oxidativo ocasionado por Al sería el principal responsable de la disfunción secretora hepática de aniones orgánicos colefilicos inducidos por el metal, vía alteración de la expresión y función de la proteína transportadora Mrp2.

380. (7699) EXPRESIÓN DE AQUAPORINAS HEPÁTICAS EN COLESTASIS INDUCIDA POR SEPSIS. LEHMANN, GUILLERMO; CARRERAS, FLAVIA; GRADILONE, SERGIO; MARINELLI, RAÚL

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET)

Los hepatocitos expresan las aquaporinas 8 y 9, las cuales facilitan el movimiento osmótico de agua en respuesta al transporte activo de solutos durante la secreción de bilis canalicular. La AQP9 se localiza exclusivamente en la membrana basolateral, permitiendo el paso de agua y solutos pequeños. La AQP8 se localiza en vesículas intracelulares, como así también en la membrana apical (canalicular). La colestasis hepatocelular es una complicación frecuente de la sepsis bacteriana, asociada a la alteración de transportadores de solutos. Objetivos: En el presente trabajo, se utilizaron dos modelos aceptados de sepsis en la rata para evaluar la expresión y rol fisiopatológico de las AQPs 8 y 9 en el contexto de la sepsis. En el primer modelo, se inyectó lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella typhimurium* en forma endovenosa. En el segundo, se provocó una peritonitis bacteriana por ligadura y punción del ciego (LPC). Resultados: Luego de 16 hs post-tratamiento, el flujo biliar disminuyó aproximadamente un 25% ($p < 0,05$; $n=4$). Por estudios de fraccionamiento subcelular e inmunoblotting, se determinó que la proteína AQP8 en membrana plasmática (MP) decayó un 55% ($p < 0,05$; $n=4$) en el modelo de LPS y un 80% ($p < 0,05$; $n=3$) en el modelo de LPC. Por el contrario, el contenido de AQP9 en MP permaneció inalterado en ambos modelos. Durante la sepsis, existe una disminución en la expresión proteica de AQP8 en la membrana plasmática de los hepatocitos sin cambios evidentes en los niveles de AQP9. La disminución en la expresión de la AQP8 podría estar implicada en los mecanismos fisiopatológicos de colestasis hepatocelular por sepsis.

381. (7896) LA ENDOTELINA 1 REGULA LA SECRECIÓN BILIAR A NIVEL CENTRAL A TRAVÉS DE RECEPTORES ETA Y DEL NERVI VAGO. RODRÍGUEZ, MYRIAN R.; SANTELLA, GISELA (1); SABBATINI, MARÍA E.; VILLAGRA, ALBERTO (2); DABAS, PAULA (3); VATTA, MARCELO S. (1); BIANCIOTTI, LILIANA G.

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; (1) Cát. Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), (2) Dep. Análisis Clínicos (3) Cát. Analítica, FFyB, UBA

La administración intracerebroventricular (icv) de diversos péptidos modifica las secreciones y/o motilidad digestiva. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el rol de la endotelina 1 (ET-1) administrada centralmente (icv) sobre la secreción biliar en ratas Sprague-Dawley con cánula icv (250-280g). Los resultados son $X \pm SEM$ (ANOVA-test de t modificado por Bonferroni) ($*: p < 0,05$ vs control (C)). La inyección icv de ET-1 (1nM) redujo el flujo biliar ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) (15min: C: 5.12 \pm 0.13; ET-1: 5.12 \pm 0.13*; 30min: C: 4.86 \pm 0.19; ET-1: 3.98 \pm 0.43*; 45min: C: 4.51 \pm 0.17; ET-1: 4.316 \pm 0.18*; 60min: C: 4.19 \pm 0.21; ET-1: 3.84 \pm 0.37*) disminuyendo tanto la excreción de ácidos biliares (AB) ($\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g} \times 10(-2)$) (15min: C: 13.42 \pm 1.08; ET-1: 4.38 \pm 0.95*; 30min: C: 11.72 \pm 0.74; ET-1: 5.42 \pm 0.75*; 45min: C: 9.65 \pm 0.36; ET-1: 5.79 \pm 0.78*; 60min: C: 8.16 \pm 0.47; ET-1: 5.74 \pm 0.98*) como la de electrolitos sodio y potasio, sin modificar la de glutatión o bicarbonato. Por el contrario, ET-1 1fM icv incrementó la secreción biliar (15min: ET-1: 6.68 \pm 0.14*; 30min: ET-1: 6.81 \pm 0.10*; 45min: ET-1: 7.03 \pm 0.30*; 60min: ET-1: 7.36 \pm 0.24*) sin modificar la excreción de AB, electrolitos o glutatión pero incrementando la excreción de bicarbonato (mEq/min/100g $\times 10(-3)$) (15min: C: 0.17 \pm 0.02; ET-1: 0.26 \pm 0.03*; 30min: C: 0.18 \pm 0.01; ET-1: 0.28 \pm 0.01*; 45min: C: 0.16 \pm 0.01; ET-1: 0.30 \pm 0.03; 60min: C: 0.18 \pm 0.01; ET-1: 0.25 \pm 0.01*). Los efectos colestático y colerético de ET-1 icv se anularon por vagotomía troncular y por pretratamiento con BQ-610 icv (antagonista ETA). El efecto inhibitorio de ET-1 sobre el flujo biliar ocurre por reducción de la fracción AB dependiente mientras que el estimulatorio por incremento de la AB independiente. Estos resultados muestran que la ET-1 icv ejerce efecto colerético o colestático dependiendo de la dosis utilizada, a través de la activación de receptores ETA centrales que inducen modificaciones en la actividad vagal.

382. (7911) EFECTOS OPUESTOS DE LA ENDOTELINA 3 SOBRE LA REGULACIÓN CENTRAL DE LA SECRECIÓN BILIAR EN LA RATA: IMPORTANCIA DEL ÓXIDO NÍTRICO. RODRÍGUEZ, MYRIAN R.; SABBATINI, MARÍA E.; SANTELLA, GISELA (1); DABAS, PAULA (2); VATTA, MARCELO S. (1); BIANCIOTTI, LILIANA G.

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; (1) Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), FFyB, UBA, (2) Cátedra de Analítica, FFyB, UBA

Las endotelinas modulan la función digestiva. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración central (icv) de endotelina 3 (ET-3) sobre la secreción biliar así como también receptores y posibles vías involucradas. Los resultados son $X \pm SEM$ ($*: p < 0,05$ vs control (C)). La administración icv de ET-3 (2 μM) redujo el flujo biliar ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) (15min: C: 5.12 \pm 0.13; ET-3: 4.33 \pm 0.2*; 30min: C: 4.86 \pm 0.19; ET-3: 4.2 \pm 0.21*; 45min: C: 4.51 \pm 0.17; ET-3: 3.96 \pm 0.19*; 60min: C: 4.19 \pm 0.21; ET-3: 3.66 \pm 0.21*), disminuyendo asimismo la excreción de ácidos biliares (AB) ($\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g} \times 10(-2)$) (15min: C: 13.42 \pm 0.95; ET-3: 6.89 \pm 0.73*; 30min: C: 11.72 \pm 0.74; ET-3: 6.69 \pm 0.65*; 45min: C: 9.65 \pm 0.36; ET-3: 5.19 \pm 0.69*; 60min: C: 8.19 \pm 0.47; ET-3: 4.57 \pm 0.41*) y de electrolitos sodio y potasio, sin modificar la de glutatión o bicarbonato. Sin embargo, ET-3 (1fM) incrementó el flujo biliar (15min: ET-3: 5.89 \pm 0.49*; 30min: ET-3: 6.1 \pm 0.44*; 45min: ET-3: 5.33 \pm 0.26*; 60min: ET-3: 6.04 \pm 0.39*) sin afectar la excreción de AB, sodio o potasio, pero incrementando la de bicarbonato (mEq/min/100g $\times 10(-3)$) (15min: C: 0.17 \pm 0.02; ET-3: 0.29 \pm 0.27; 30min: C: 0.18 \pm 0.01; ET-3: 0.26 \pm 0.02*; 45min: C: 0.16 \pm 0.01; ET-3: 0.29 \pm 0.02*; 60min: C: 0.18 \pm 0.01; ET-3: 0.26 \pm 0.02*). La administración icv de L-NAME inhibió las respuestas de ET-3. El efecto colestático se inhibió en presencia de BQ-788 (antagonista ETB) mientras que el colerético por BQ-788 y BQ-610 (antagonista ETA). En conclusión, la administración icv de ET-3 induce efectos opuestos sobre el flujo biliar dependiendo de la dosis usada, siendo ambos mediados por el NO central. El efecto colestático se produce por reducción de la fracción AB dependiente y es mediado por ETB mientras que el colerético por incremento de la fracción AB independiente y mediado por receptores atípicos (bloqueables por antagonistas de ETA y ETB). Estos resultados indican que la ET-3 participa en la regulación central de la secreción biliar.

383. (7987) CONTROL METABÓLICO DE LA FRUCTOSA-1,6-BIFOSFATASA (FBPASA) EN LA GLUCONEOGÉNESIS Y EN LA GLUCÓLISIS EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS. FAVRE, C.; MARIN, S.; CASCANTE, M.; GUINOVART, J

Instituto de Fisiología Experimental-CONICET. UNR; Ingeniería Metabólica-Parque Científico de Barcelona. UB.

En la producción hepática de glucosa participan la gluconeogénesis y la glucoenólisis, procesos claves en el ayuno y en la hiperglucemia diabética. El Análisis de Control Metabólico evalúa la fuerza de control ejercida por un paso en una vía metabólica en células intactas. La fuerza de control de una enzima indica en qué sentido y magnitud varía un flujo ante un cambio en la concentración catalítica de la enzima y está representada por un valor calculable denominado Coeficiente de Control (C). En este trabajo se determinó el C de la enzima gluconeogénica FBPasa en la gluconeogénesis (C(Jglucosa)) y en la glucoenólisis (C(Jlactato)) en hepatocitos. Células controles o infectadas con títulos del adenovirus recombinante AdCMV-FBPasa capaces de producir 3 niveles de sobreexpresión, fueron incubadas 24 h con 1,2-(13)C-glucosa: glucosa 25 mM, tras lo cual se reemplazó el medio por otro sin glucosa y se siguió la incubación 16 h. Los medios y placas de todas las condiciones se congelaron, se determinaron los niveles de glucosa y lactato y la actividad FBPasa. Se obtuvieron extractos para analizar los (13)C-derivados de glucosa y de lactato por GC/MS y se procesaron matemáticamente las contribuciones relativas de los isotopómeros m2 para obtener los flujos metabólicos de pro-

ducción de glucosa (Jglucosa) ó lactato (Jlactato). Jglucosa en condición 'alimentado', mostró una media de 620 nmol/10(6)cel que alcanzó, por ejemplo, el valor de 1370 nmol/10(6)cel ($p < 0.01$) en las células en las que se sobreexpresaba la FBPasa 2 veces respecto al control. El análisis matemático de los valores de flujo y actividad enzimática permitió el cálculo del C(Jglucosa) en esta condición, que resultó ser fuertemente positivo y mayor que en la condición de 'ayuno', donde los flujos basal y con sobreexpresión x 2 tuvieron medias de 460 y 720 nmol/10(6)cel ($p < 0.01$), respectivamente. Contrariamente, los C(Jlactato) fueron débilmente negativos y de magnitud comparable en las condiciones 'alimentado' y 'ayuno'.

GASTROENTEROLOGÍA, METABOLISMO Y NUTRICIÓN 2

384. (6597) CANDESARTAN, ÚNICO ANTAGONISTA RECEPTOR AT1 DE LA ANGIOTENSINA II COMO ANTIINFLAMATORIO Y CITOPROTECTOR GÁSTRICO. LAUDANNO, OSCAR MIGUEL; BASA, E.; CESOLARI, J.; GODOY, A.

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario; Gastroenterología Exp. Facultad de Ciencias Médicas Rosario.

Se estudió a Candesartan (Ca) como protector gástrico ante el Etanol (Et), Estrés (E), AINEs y el efecto antiinflamatorio, en modelo del edema plantar por carragenina (Carra) y su comparación con Telmisartan (Te), Losartan (Lo), Valsartan (Va) y Olmesartan (Ol). Grupos aleatorios de ratas hembras Wistar ($n = 7$ c/grupo), 200 g, en ayuno 24 hs excepto agua ad-libitum; se realizaron: I. a) Et 96° 1 ml orogástrico (OG), en bolo y se esperó 20 min (T). II. E por inmovilización e inmersión en agua 18°C 6 hs (T). III. Indometacina (In) 30 mg/Kg OG 24 hs (T), y IV. Carra 0.1 ml 1% plantar. En los 4 grupos se usó 60 min antes al Fisiol. y las dosis: Ca 1-10 mg/Kg sc; Lo 25-50 mg/Kg sc; Te 1-20 mg/Kg sc; Va 25-50 mg/Kg sc y Ol 1-10 mg/Kg sc. Las ratas fueron sacrificadas con sobredosis de éter, laparotomía, gastrectomía total, se tabuló % área lesional macroscópica gástrica, luego histología HE y MPO. El edema plantar Carra se midió a las 4 hs por pletismografía. Se calculó t de Student y ANOVA. El % área lesional gástrica dio: I. Et. 35.5 ± 5.5 ; Ca-Et 1.0 ± 0.1 (< 0.001); Lo 70 ± 7 (< 0.03); Te 75 ± 6 ; Va 81 ± 6 y Ol-Et 71 ± 7 (< 0.03). II. E 75 ± 5 ; Ca-Et 30 ± 4 (< 0.03); Lo 90 ± 4 (< 0.05); Te 87 ± 6 ; Va 91 ± 6 y Ol-E 88 ± 7 (< 0.05). III. In 65 ± 7 ; Ca-In 12 ± 3 (< 0.01); Lo 80 ± 7 (< 0.03); Te 75 ± 6 (< 0.05); Va 78 ± 6 y Ol-In 77 ± 6 (< 0.05). IV. Carra $130 \pm 20\%$; Ca 50 ± 10 (< 0.01); Lo 130 ± 15 (ns); Te 135 ± 20 ; Va 120 ± 20 y Ol-Carra $140 \pm 18\%$ (ns). La MPO en Estrés dio: 340 ± 30 mg/proteína; Ca-E 43 ± 7 (< 0.001); Lo 520 ± 60 (< 0.02); Te 580 ± 55 ; Va 610 ± 70 y Ol 540 ± 60 (< 0.03). Ca dio citoprotección gástrica; en contraste, Lo, Te, Va y Ol agravaron las lesiones inducidas por Etanol, Estrés, AINEs. Ca dio a la MPO y al edema plantar por Carra efecto antiinflamatorio y éste podría ser el mecanismo citoprotector gástrico, diferente a los otros antag. recep. AT1 de la Angiot. II.

385. (6692) AUMENTO DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE P-GLICOPROTEÍNA INTESTINAL EN RATAS TRATADAS CON ESPIRONOLACTONA. GHANEM, CAROLINA I; GÓMEZ, PAULA C; ARANA, MARÍA C; PERASSOLO, MARÍA; RUIZ, MARÍA L; VILLANUEVA, SILVINA SM; LUQUITA, MARCELO G; VEGGI, LUIS M; CATANIA, VIVIANA A; BENGOCHEA, LAURA A; MOTTINO, ALDO D

Cátedra de Fisiopatología. FFyB.UBA; Instituto de Fisiología experimental (IFISE), UNR.

Previamente se demostró que la espirolactona (E) induce la actividad de enzimas de biotransformación de fase I y II. Objetivo: Evaluar el efecto de E sobre la expresión y actividad

del transportador de drogas P-glicoproteína (P-gp) en intestino de ratas Wistar. Materiales y Métodos: Grupo E: inyección con E (200 μ moles/kg/día, por 3 días consecutivos, i.p., $n=3$); grupo C: inyección con vehículo ($n=3$). El intestino delgado fue dividido en cuatro segmentos (Seg) iguales (I, II, III y IV, desde la zona proximal a la distal) y se determinó el contenido de P-gp por westernblot en vesículas de ribete en cepillo de cada seg. En el seg IV se midieron los niveles de ARNm por northernblot y se evaluó la actividad de P-gp en modelo de saco intestinal, utilizando incubados en buffer Krebs-Henseleit con rodamina (sustrato de P-gp, 50 μ M), con y sin agregado de verapamilo (inhibidor selectivo de P-gp, 100 μ M). Resultados (media \pm DS): Expresión de P-gp: (unidades arbitrarias): seg I: $E=238 \pm 14$ vs $C=38 \pm 10^*$; seg II: $E=663 \pm 122$ vs $C=169 \pm 127^*$; seg III: $E=662 \pm 107$ vs $C=213 \pm 74^*$; seg IV: $E=852 \pm 431$ vs $C=118 \pm 48^*$. Contenido de ARNm (unidades arbitrarias): $E=5.01 \pm 0.19$ vs $C=2.43 \pm 0.70^*$. Actividad inicial (10 min) de P-gp (pmol rodamina/min/gr de tejido): $E=295 \pm 83$ vs $C=132 \pm 74^*$. La actividad de P-gp fue casi nula en presencia de verapamilo en ambos grupos experimentales, confirmando la especificidad de transporte de rodamina por P-gp. (*significancia: $P < 0.05$). La E es un inductor de P-gp, aumentado su expresión a lo largo de todo el intestino delgado. El aumento de ARNm indica regulación transcripcional. Considerando que la inducción de P-gp por E tiene repercusión funcional, y que E se utiliza como diurético, postulamos que la administración oral de E junto con otros fármacos sustratos de P-gp podría modificar la biodisponibilidad de estos últimos.

386. (6736) DESARROLLO DE UN MÉTODO FLUOROMÉTRICO PARA DETERMINAR VIABILIDAD DE SUSPENSIONES DE HEPATOCITOS AISLADOS SOMETIDOS A PROTOCOLOS DE PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA. GIRAUDI, PABLO (1); LUCIANA, ALMADA (1); MAMPRIN, MARÍA (1); GUIBERT, EDGARDO (2); GRACIELA, FURNO (3); RODRÍGUEZ, JOAQUÍN V. (1)

(1) *Farmacología, (2) Biología Molecular, (3) Estadística Fac. Cs. Bioq. y Farm. - UNR*

Al presente existen discrepancias entre los ensayos utilizados para establecer la viabilidad de células en suspensión. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método fluorométrico (IPm), que permita determinar la viabilidad de suspensiones de hepatocitos sometidas a protocolos de preservación hipotérmica. Se utilizó la sonda fluorescente yoduro de propidio (IP) ($E_{ex}=514$ nm, $E_{em}=610$ nm) a una concentración final de 10 μ g/mL en PBS. A 3 mL de PBS se le agregaron 50 μ L de IP y hepatocitos (150×10^3 (3) células), para obtener la lectura de fluorescencia directa (Fd) al cabo de dos minutos de incubación. Luego se adicionó digitonina (92.3 μ g/mL, concentración final) para permeabilizar la totalidad de las células y se midió la fluorescencia total a los 4 minutos (Ft). La viabilidad se calculó como: $\%V = [(Ft - Fd) / Ft] \times 100$. Para validar el ensayo se analizaron mezclas de células vivas y muertas ($n=11$ preparados). Se determinó la viabilidad comparando 3 métodos: IPm, retención de lactato deshidrogenasa (LDH) y exclusión de azul tripán (EAT). Las ecuaciones para el modelo de regresión y correlación lineal fueron: a) IPm vs EAT: $\%VIPm = -9,7 + 1,1\%VEAT$ ($R=0,97$); b) IPm vs LDH: $\%VIPm = -11,5 + 1\%VLDH$ ($R=0,99$) y c) LDH vs EAT: $\%VLDH = 21,7 + 0,88\%VEAT$ ($R=0,98$). Se determinaron los coeficientes de variación (CV) ($n=4$ preparaciones) en muestras de hepatocitos preservados (24 hs a 0°C, solución UW) siendo: LDH=0,10; IPm=1,10 y EAT=1,40. El método propuesto es simple y rápido (insume 6 minutos por ensayo), y permite dentro del rango de 50-100% de células vivas realizar determinaciones de viabilidad, con una mayor precisión y exactitud que EAT. LDH presenta el menor CV, pero sobreestima la viabilidad debido a la retención inespecífica de actividad LDH en células no viables.

387. (6927) DESARROLLO DE UN MINIBIORREACTOR FUNCIONAL PARA HÍGADO BIOARTIFICIAL. EVALUACIÓN IN VITRO DEL SISTEMA. RODRIGUEZ, JOAQUÍN V. (1);

SCANDIZZI, ANGEL L. (1); ALMADA, LUCIANA L. (1); MAMPRIN, MARÍA E. (1); GUIBERT, EDGARDO E. (2); SECCHI, MARIO (3)

(1) *Biología Molecular* (2) *Farmacología, Fac. de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.* (3) *Inst. Univ Italiano Rosario*

Con el objetivo de desarrollar un dispositivo con funciones de hígado bioartificial, diseñamos un prototipo de minibioreactor para optimizar parámetros de función en escala mínima. El sistema consta de dos compartimientos, a- el plasmático (Cp) que es perfundido con sangre entera (de carnero), circulante a través de fibras huecas (140 fibras, polímero de poliéster (PEPA), $\phi=210 \mu\text{m}$, Vol sangre=16 mL) a un flujo de 9 mL/min y b- el compartimiento celular (Cc) que contiene $53 \pm 14.10(6)$ hepatocitos de rata (previamente preservados durante 72 hs a 0°C en solución UW) en un volumen máximo de 8.9 ± 0.8 mL. El sistema contiene un oxigenador interno que aporta 12 mL/min de carbógeno. Durante un período de 120 min de funcionamiento se evaluaron los siguientes parámetros: Eficiencia de detoxificación de una carga de Amonio (EDA), la relación de osmolaridades (OsmCp/OsmCc), Viabilidad del componente celular (Exclusion de Azul de Tripán) y las conc. plasmáticas de Glucosa, Urea y Creatinina. Para evaluar la EDA, se administró una carga de Amonio que produjo una conc. plasmática de 0.345 ± 0.037 mM (n=4). Al cabo de 120 min de perfusión la EDA fue del 75.4 ± 9.8 % de la dosis (n=4 experimentos). Se estimó también la EDA del sistema funcionando sin células en las mismas condiciones experimentales. La OsmCp/OsmCc se mantuvo en 1.01 ± 0.02 durante la perfusión indicando que no hubo restricción al flujo entre compartimientos Cp y Cc. La producción de glucosa del componente celular alcanzó 357 ± 33 nmoles/10(6) cel a los 120 min de perfusión. Durante este período, la viabilidad del componente celular disminuyó 33 ± 11 %. El minibioreactor desarrollado presenta las siguientes ventajas respecto a otros diseños propuestos: 1- puede ser perfundido con sangre entera, 2- se utilizan volúmenes mínimos de sangre y carga celular y 3- el componente celular (hepatocitos preservados 72 hs) conserva una marcada capacidad de detoxificación de amonio.

388. (7113) ESTUDIO DE LA EXPRESION GENICA DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL CICLO DE LA UREA DE HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA SOMETIDOS A PRESERVACION Y POSTERIOR REOXIGENACION. ALMADA, LUCIANA; BELLAROSA, CRISTINA (1); GIRAUDI, PABLO; MAMPRIN, MARIA; MEDIAVILLA, MARIA (2); GUIBERT, EDGARDO (2); TIRIBELLI, CLAUDIO (1); RODRIGUEZ, JOAQUIN

Area Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (1) CSF, Trieste, Italia; (2) Biología Molecular

El ciclo de la urea es la principal vía para la detoxificación de amonio, metabolito que en pacientes con falla hepática aguda (FHA) se acumula y produce un aumento de la presión intracraneal, afectando el sistema nervioso central. Con el objetivo de investigar el efecto de la preservación y reoxigenación sobre las enzimas del ciclo de la urea de hepatocitos (H) (utilizados en el hígado bioartificial o trasplante celular, alternativas terapéuticas para la FHA), hemos estudiado los niveles de mRNA de los genes de la carbamil fosfato sintetasa I (CFSI) y ornitina transcarbamilasa (OTC), con RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se diseñaron 3 grupos: G[II]: H recién aislados y reoxigenados (60 min, solución Krebs-Henseleit, 37°C); G[III]: H preservados 120 hs a 0°C en solución de la Universidad de Wisconsin (UW) y reoxigenados; y G[IV]: H preservados 120 hs a -4°C en UW con el agregado del crioprotector 1,4-butanodiol y reoxigenados. Los niveles de transcripto (tabla) fueron normalizados con respecto al contenido de mRNA de β -actina y se corrigen con el nivel de transcripto a $t=0$ min del G[III].

OTC (n=3)	t=0 min	t= 60 min	CFSI (n=3)	t=0 min	t=60 min	
G[II]	0.93 ± 0.11	0.87 ± 0.06	G[II]	0.98 ± 0.04	0.48 ± 0.09	((§)) p<0.001
G[III]	0.97 ± 0.08	0.92 ± 0.23	G[III]	0.85 ± 0.13	0.62 ± 0.13	
G[IV]	0.63 ± 0.12	0.88 ± 0.13	G[IV]	0.58 ± 0.12	0.46 ± 0.10	((*) diferente de G[II] y G[III]; p<0.05

Los niveles de mRNA para CFSI son sensibles al proceso de reoxigenación normotérmica. La incorporación del crioprotector a la UW y/o la disminución de la temperatura de almacenamiento afectaría los niveles de transcripto para ambos genes, pero no les impediría finalizar la reoxigenación con valores comparables al control.

389. (7170) MODIFICACIONES INDUCIDAS POR INDOMETACINA EN LA ACTIVIDAD PLAQUETARIA DE RATAS CON HIPERTENSION PORTAL TRATADAS POR DOSIS ULTRABAJAS DE ASPIRINA. EIZAYAGA, FRANCISCO; AGUEJOUF, OMAR; BELON, PHILIPPE; DOUTREMEPUICH, CHRISTIAN

Cátedra de Fisiopatología, FFyB, UBA; Laboratoire d'Hématologie, Université de Bordeaux 2, Victor Segalen, Bordeaux, France

En trabajos anteriores mostramos el incremento de la actividad plaquetaria de las dosis ultrabajas de Aspirina (ASA) en ratas con hipertensión portal (HP) por estenosis reglada de la vena porta. Se utilizó Indometacina (IM) para bloquear la COX y estudiar posibles modificaciones en estos resultados. Se utilizaron ratas Wistar machos de 220g (n= 11-16/grupo). Se provocó HP por estenosis reglada con operación simulada como control (Sh). Se utilizó IM en dosis de 2.5 mg/kg, ASA en concentración final teórica de 5.5×10^{-32} M, 1mg/kg, vsc [1] y agua destilada como placebo. Se midió el tiempo de hemorragia en la cola y la actividad plaquetaria in vivo por trombosis inducida por láser [1]. 8 grupos: Sh-placebo(P)-P (A), Sh-P-ASA (B), HP-P-P (C), HP-P-ASA (D), Sh-IM-P (E), Sh-IM-ASA(F), HP-IM-P (G) e HP-IM-ASA (H). Se estudió el tiempo de hemorragia (TH) en la cola del animal, y la actividad plaquetaria in vivo de acuerdo a [1] medida como duración de la embolización (DE) y número de émbolos (NE). Resultados (M \pm SEM/ t-test): TH (seg): A 136 ± 7.67 ; B 105.6 ± 5.73 ; C 213.6 ± 23.27 ; D 127.3 ± 11.12 ; E 200.7 ± 11.56 ; F 152.8 ± 9.8 ; G 207.1 ± 32.04 ; H 231.6 ± 30.54 . (A vs. B,C,E; F vs. B,E y D vs. C,H ; p<0.05). DE (min) A 2.375 ± 0.18 ; B 3.57 ± 0.44 ; C 1.6 ± 0.29 ; D 2.33 ± 0.22 ; E 1 ± 0.21 ; F 3.4 ± 0.52 ; G 0.83 ± 0.27 ; H 3.3 ± 0.36 (A vs. B,C,E; D vs. C,H; H vs. G,E; E vs. F p <0.05) . NE: A 5.45 ± 0.4 ; B 8.46 ± 1.18 ; C 3.13 ± 0.55 ; D 4.83 ± 0.38 ; E 2.3 ± 0.28 ; F 7.36 ± 0.87 ; G 2.07 ± 0.4 ; H 7.63 ± 0.94 (A vs. B,C,E; D vs. C,H; E vs. F,H y G vs. H, p<0.05).[1]Doutremepuich et al, Semin in Thromb and Homeostasis, vol 22, Supplem 1, 1996. La IM bloquea la disminución del tiempo de hemorragia provocada por las dosis ultrabajas de ASA sobre las ratas Sh e HP. Paradójicamente en la actividad plaquetaria in vivo, acentúa el efecto pro agregante de las dosis ultrabajas de ASA.

390. (7437) TERT-BUTILHIDROPERÓXIDO (tBOOH) INDUCE ESTRÉS OXIDATIVO (EO) EN HEPATOCITOS POR UN MECANISMO CA(2+)-CALMODULINA DEPENDIENTE, VÍA FORMACIÓN DE POROS DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL (PTPM). PÉREZ, LEONARDO MARTÍN; OCHOA, JUSTINA ELENA; SÁNCHEZ POZZI, ENRIQUE JUAN; ROMA, MARCELO GABRIEL

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE), CONICET-Fac. de Cs. Bioq. y Farm., UNR.

La modulación por vías de señalización del EO ha sido indagada utilizando tBOOH como pro-oxidante en hepatocitos aislados. Este compuesto es metabolizado a radicales alcoxilo y peroxilo, los

cuales inducen alteraciones mitocondriales que amplifican/perpetúan el EO inicial, al posibilitar el escape de electrones de la cadena respiratoria. Dado que tBOOH requiere de Ca(2+) para inducir EO (Hepatology 29:1523,1999), analizamos si vías de señalización dependientes de Ca(2+) (PKC, PKII) están involucradas en este proceso. La participación de PTPM, uno de los eventos primarios que conducen a la disfunción mitocondrial, fue también indagada. tBOOH (500 µM, 15 min) indujo EO, evidenciado por un aumento del 723 ± 156% (p<0.001) en la generación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La quelación del Ca(2+) intracelular con BAPTA/AM (50 µM) y el antagonista de Ca(2+)-calmodulina W7 (100 µM) redujeron en similar magnitud la formación de TBARS inducida por tBOOH (-28 ± 5% y -28 ± 2%, respectivamente, p<0.01). El agente elevador de Ca(2+) citosólico tapsigargina (5 µM) no exacerbó dicho proceso. Ni el pre-tratamiento con el inhibidor de PKC estaurosporina (100 µM) ni su activador forbol miristato acetato (1 µM) modificaron la capacidad de tBOOH para aumentar TBARS. Similarmente, el inhibidor de PKII calmidazolium (5 µM) no tuvo efectos. En cambio, el pre-tratamiento con ciclosporina A (5 µM), un inhibidor de la formación del PTPM, disminuyó un 22 ± 3% (p<0.025) la generación de TBARS inducida por tBOOH. Concluimos que, en parte, el EO inducido por tBOOH requiere formación de PTPM y depende de la formación del complejo Ca(2+)-calmodulina. Dicho cambio en la membrana mitocondrial podría estar regulado directamente por proteínas Ca(2+)-calmodulina dependientes distintas de PKII o PKC, tales como proteasas (ej., calpainas) o fosfatasa mitocondriales (ej., calcineurina).

391. (7455) INFUSION DE HEPATOCITOS POR VIA PORTAL EN UN MODELO DE XENO TRASPLANTE DISCORDANTE CERDO-RATA. VENTURI, C (1, 2); BARBICH, M(1); LORENTI, A (1); CEBALLOS, C (1); HIDALGO, A (1); TELLO, G (1); D'AGOSTINO, D (2); ARGIBAY, P (1)

(1) ICBME-Hospital Italiano de Buenos Aires; (2) Servicio de Hepatología y Trasplante Hepático Infantil. Hospital Italiano de Buenos Aires.

El trasplante de hepatocitos ha sido propuesto como una alternativa al trasplante ortotópico de hígado en pacientes con enfermedades metabólicas, con este objetivo se evaluó en un modelo experimental de xenotrasplante discordante, la capacidad de anidación de hepatocitos porcinos en hígado de rata y la vía de inoculación de las células trasplantadas. Se trasplantaron 10 ratas Wistar adultos con una suspensión de hepatocitos porcinos frescos marcados con 4',6'-Diamidino-2-fenilindol (DAPI); y 2 ratas fueron empleadas como control de procedimiento quirúrgico. Se inyectaron 3 x10(6) hepatocitos frescos suspendidos en 0.5 ml de solución de Hanks. Los animales recibieron TACROLIMUS como inmunosupresor en una dosis pretrasplante de 5 mg/kg/día y 10 mg/kg/día en días subsiguientes vía oral. Los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos evaluándose en cada caso la presencia de células marcadas, hepatograma y glucemia. El 92% (11/12) de los animales operados sobrevivieron al procedimiento. La dosis de Tacrolimus administrada se correspondió con un dosaje en suero de 5.0 + 0.2 ng/ml. Los valores de glucemia (172.28mg/dl±15.45) no difirieron de los valores de animales controles (206.5mg/dl± 56.86). Las enzimas hepáticas no mostraron incremento significativo con respecto a animales controles: AST(U/L): 83,50±20,60 vs 70,33±11,24 y ALT(U/L): 53,30±7,27 vs 51,67±17,56. Las células marcadas con DAPI fueron detectadas por fluorescencia durante el tiempo que duró el seguimiento: 15 días. La dosis de Tacrolimus recibida permitió sostener el implante durante el periodo de estudio (15 días) sin efecto hiperglucemiante. La infusión de hepatocitos por vía portal no mostró complicaciones, evidenciándose la presencia de hepatocitos distribuidos en el parénquima hepático. Asimismo la ausencia de alteraciones de las enzimas hepáticas nos permite inferir que esta modalidad de trasplante no generó injuria hepática evidente.

392. (7636) EL URSODESOXICOLATO (UDC) PREVIENE LA ALTERACIÓN EN LA ACTIVIDAD DE MRP2 INDUCIDA

POR ETINILESTRADIOL (EE) EN LA RATA. CROCENZI, FERNANDO; D'ANDREA, VANESA; CATANIA, VIVIANA; LUQUITA, MARCELO; PELLEGRINO, JOSÉ; SÁNCHEZ POZZI, ENRIQUE

Instituto de Fisiología Experimental, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR-CONICET. Rosario

El EE induce colestasis afectando las fracciones dependiente e independiente de sales biliares del flujo biliar. La disminución de la última se debería, en parte, a una reducción en la expresión del transportador canalicular Mrp2. La administración de UDC revierte la disminución del flujo biliar inducida por el estrógeno, pero su efecto sobre Mrp2 en este modelo de colestasis no se ha estudiado aún, por lo que el objetivo fue analizar la protección de UDC sobre el daño inducido por EE en la actividad de Mrp2 usando el sustrato dinitrofenil-glutation (DNPG). Métodos: Ratas Wistar macho se dividieron en 3 grupos: i) tratadas con EE (5 mg/kg pc, sc, 5 días) y UDC (25 mg/kg pc, ip, 5 días) (EU), ii) tratadas con EE y solvente (E) y iii) tratadas sólo con solvente (C). El sexto día se inyectó 1-cloro-2,4-dinitro-benceno (10 µmol/kg pc, ev). Este compuesto se conjuga en hígado para dar DNPG, cuya excreción se analizó recolectando bilis cada 10 min por 60 min. Utilizando fracciones de hígado de otras ratas de los mismos grupos se obtuvieron preparaciones de membranas totales (MT) para evaluar los efectos de EE y UDC sobre la expresión de Mrp2 por western blot. Resultados (media ± DE, n=3): EE redujo la excreción de DNPG (µmol/kg pc) en un 55% y UDC restauró completamente la alteración (C: 2,7±0,1, E: 1,2±0,4(a), EU 2,2±0,4(b)). La densitometría de los western blot (unidades arbitrarias) para Mrp2 en MT mostró que UDC no restaura la disminución del transportador por EE (C: 347±16, E: 277±42(a), EU: 278±29(a)). (a)significativamente diferente de C, (b)significativamente diferente de E (p<0,05). La administración de EE redujo la expresión de Mrp2 lo que llevó a una alteración en la excreción de DNPG. UDC restauró la actividad de transporte pero no mejoró la expresión del transportador en la membrana sugiriendo que la acción de esta sal biliar se debería a una mejora funcional (mayor actividad por molécula) y no a una reversión del efecto de EE.

HEMATOLOGÍA 1: ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y FISIOLÓGIA

393. (6662) PROPIEDADES BIOMECAÑICAS OSEAS EN RATAS CON ESTADO HEMOLITICO FARMACOLOGICO. OLIVERA, MARIA I.; CONTI, MARIA I.; MARTINEZ, MARIA P.; LEZON, CHRISTIAN E.; META, ISAAC F.; BOZZINI, CARLOS E.; ALIPPI, ROSA M.

Catedra De Fisiología, Facultad De Odontología, Universidad De Buenos Aires

En un modelo de rata con estado hemolítico no compensado hemos observado disminución del espesor de la cortical diafisaria femoral con aumento del espacio medular, posiblemente asociado con el incremento de la eritropoyesis. El objetivo del presente estudio fue estimar las propiedades estructurales, geométricas y materiales de la diáfisis femoral en ratas Sprague-Dawley hembras inmaduras con estado hemolítico inducido por fenilhidrazina (PHZ, 60 mg/kg 2/sem x 6 sem). El tratamiento indujo una intensa reticulocitosis (T[41]= 3,4% vs 67.0%), con aumento de la incorporación esplénica y eritrocitaria de Fe59 (T[41]= 1,1 vs 19,7%; 5,4 vs 38,9%, respectivamente), índices de intensa estimulación eritropoyética. El tratamiento no modificó la tasa de crecimiento corporal ni el consumo diario de alimento. Las propiedades biomecánicas óseas fueron ensayadas mediante el test de flexión a 3 puntos en un aparato Instron mod.4442. Los animales tratados mostraron disminución de: carga de fractura (84,4±9,4(ES) vs 47,7±6,0 N), carga elástica límite (65,9±5,7 vs 41,4±4,6 N), rigidez diafisaria (207,6±13,4 vs 126,4±9,6 N/mm), estrés elástico límite (36,5±2,8 vs 22,9±2,6 N/mm(2), y módulo

de elasticidad (806,0±95,6 vs 373,6±43,4 N/mm²); y aumento del momento de inercia (11,8±0,9 vs 15,5±0,7mm⁴) sin alteración del área de sección transversal (7,1±0,3 vs 6,2±0,7mm²). La inducción de un estado hemolítico farmacológico, asociado con aumento del espacio medular por incremento de la eritropoyesis, produce deterioro de la calidad del material óseo cortical diafisario y de la resistencia del material a la producción de microfracturas, evidenciada por la disminución de la capacidad máxima para soportar estrés. Este efecto se traduce en reducción de la resistencia efectiva del hueso a perder su integridad como cuerpo único, afectándose así la competencia mecánica de la diáfisis femoral.

394. (6964) ESTUDIO COMPARATIVO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MEMBRANAS DE ERITROCITO DE RATA, EQUINO, CAPRINO Y BOVINO ANALIZANDO QUIMIOLUMINISCENCIA Y COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS. IGLESIAS, BERNARDO; ARCEMIS, CÉSAR; CATALÁ, ÁNGEL

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

Los eritrocitos están normalmente expuestos a altas concentraciones de oxígeno y a sus especies reactivas. El objetivo de este estudio fue analizar la peroxidación lipídica de membranas de eritrocito de rata, equino, caprino y bovino con concentraciones crecientes de ter-butyl hidroperóxido (tBH), utilizando quimioluminiscencia y variación porcentual de la composición de ácidos grasos. Las membranas de eritrocito de rata se caracterizaron por tener 27.64 ± 0.71% de ácido araquidónico (20:4 n6) y 3.72 ± 0.20% de ácido docosahexaenoico (22:6n3). La composición de ácidos grasos de membranas de eritrocito de equino, caprino y bovino se caracterizó por un alto contenido de ácido oleico (18:1 n9), 28.48 ± 0.31%, 39.74 ± 4.18% y 43.86 ± 0.39%, respectivamente y un bajo contenido de 20:4 n6 y 22:6 n3 susceptibles de peroxidación. El porcentaje de ácido linoleico (18:2 n6) fue mayor en equino y bovino en comparación con rata y caprino. El perfil de peroxidación lipídica en función del tiempo (leída cada 12 min durante 190 min) de membranas de eritrocito de rata fue máximo a los 12 min de incubación, observándose un descenso de 18:2 n6, 20:4 n6 y 22:6 n3, todos proporcionales a la concentración de tBH. El incremento de la quimioluminiscencia en membranas de eritrocito peroxidados (32 mM tBH) respecto de sus controles fue: rata 184%; caprino 50%, bovino 46% y equino 17%. Los ácidos grasos poli no saturados presentes en membranas de eritrocito exhibieron alta sensibilidad al daño oxidativo que se incrementó en función del número de dobles ligaduras de los ácidos grasos. La emisión luminica en membranas de eritrocito de equino, caprino y bovino fue muy baja y dependiente de la concentración de tBH, pero no se observaron cambios en la composición de ácidos grasos. Podemos concluir que el bajo grado de no saturación de ácidos grasos en membranas de eritrocito de equino, caprino y bovino las hace menos susceptibles a la peroxidación lipídica.

395. (7098) EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE HIERRO SOBRE LOS MECANISMOS QUE MEDIAN SU CAPTACIÓN EN CÉLULAS K562. PÉREZ, GLADYS; VITTORI, DANIELA; PREGI, NICOLÁS; GARBOSSA, GRACIELA; NESSE, ALCIRA

Laboratorio de Análisis Biológicos, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA

Han sido descriptos dos tipos de mecanismos que median la incorporación de hierro (Fe). Por un lado, receptores específicos para la captación del metal unido a transferrina: RTf y RTf2. Por otro, una vía alternativa para el Fe presente en la forma de complejos de bajo peso molecular, en la que intervienen proteínas como el transportador de metales divalentes DMT1. El objetivo fue estudiar el efecto de la disponibilidad de Fe sobre la regulación de los distintos mecanismos de captación del metal. Se

emplearon células de la línea humana K562 que expresan RTf, RTf2 y DMT1. Metodología empleada: cultivos bajo condiciones de exceso o depleción de Fe; evaluación de la expresión de RTf y RTf2 a nivel de ARNm (RT-PCR) y de proteína (immunoblotting) y determinación de la velocidad de incorporación de (59)Fe. Mientras que el exceso de Fe regula negativamente la expresión del RTf, el tratamiento con el quelante desferrioxamina (Df) indujo aumento en los niveles de ARNm del RTf pero no del RTf2. Los resultados obtenidos para el RTf fueron corroborados por immunoblotting. Luego de 24 h de cultivo bajo distintas condiciones de disponibilidad de Fe, la captación del radioisótopo por la vía alternativa sólo fue modificada en presencia de exceso del metal (C: 2110/1610-2830; Df: 1780/1730-2250; Fe: 37000/30500-44100 cpm; n=3 P<0,01). Este efecto fue dependiente de la concentración extracelular de Fe y se manifestó en un rápido aumento de la velocidad de incorporación de (59)Fe (pulso de 2 h) por el agregado de Fe no marcado (C: 0,049/0,035-0,058; Fe 20 mM: 0,112/0,070-0,160; Fe 200 mM: 2,836/1,742-4,016 ng Fe/106 cél/h; n=4 P<0,05). Los resultados apoyan la hipótesis que atribuye a cada mecanismo diferente función biológica. Mientras que la vía mediada por RTf participa en la incorporación del Fe necesario para cubrir las necesidades metabólicas, la alternativa desempeñaría un rol en el proceso de detoxificación, eliminando del medio las moléculas del metal potencialmente tóxicas.

396. (7402) PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA QUE CLIVA AL FACTOR VON WILLEBRAND (ADAMTS-13). KEMPFER, ANA CATALINA; AMARAL, MARÍA MARTA; VERA, EZEQUIEL; FARIÁS, CRISTINA; LAZZARI, MARÍA ANGELA

Instituto de Investigaciones Hematológicas «Mariano R. Castex»

Desarrollamos la purificación parcial de ADAMTS-13 por métodos de buen rendimiento para proteínas. Se ensayaron los esquemas de preparación de crioprecipitados (1) y preparación de concentrados con polietilenglicol al 4% (2), tratamiento con glicina (3), y con NaCl (4) según técnica de Thorell. Además, se combinaron en serie el sobrenadante obtenido del método 1 con la precipitación del método 2 (5) y el precipitado dializado del método 2, con el método 1 (6). Se determinó la actividad de la ADAMTS-13 sobre VWF purificado humano con detección por unión del VWF al colágeno, el VWF: Ag por ELISA, fibrinógeno por inmunoelectroforesis y proteínas por el método de Bradford. La actividad específica (AE) de cada parámetro se expresó en unidades por g de proteína (U/g). La purificación se expresó como cociente entre la AE de las muestras (U/g) y la del plasma original (14 U/g). Los resultados (media±SD) de purificación de los precipitados (a) y sobrenadantes (b) obtenidos (n=3), se muestran en la Tabla

Métodos	ADAMTS-13 en a	ADAMTS-13 en b	VWF:Ag en a	VWF:Ag en b	Fibrinógeno en a	Fibrinógeno en b
1	1,5 ±0,7	3,3±1,1	73,0±15,0	0,2±0,1	23,0±10,0	0,3±0,1
2	12,0±6,0	4,0±1,0	35,0±11,0	0,3±0,1	22,0±10,0	0,6±0,2
3	1,3±0,5	10,0±4,0	5,0±1,0	27,0±8,0	431,0±50,0	2,0±0,0
4	3,5±1,1	2,0±1,0	172,0±78,0	3,0±1,0	17,0±3,0	1,3±0,5
5	1,0±0,3	1,0±0,1	1,4±1,1	0,5±0,2	no	no
6	11,0±4,0	9,0±2,0	71,0±15,0	0,8±0,3	31,0±10,0	0,4±0,1

Los métodos que evidenciaron mayor AE de ADAMTS-13 respecto al plasma original son: 2a, 3b, 6a y 6b. El método que generó ADAMTS-13 menos contaminada es el 6b, lo que indica que la combinación de los métodos es adecuada para la obtención de ADAMTS-13 con fines de investigación y para su posible uso terapéutico.

397. (7443) ESTUDIO CUALI- CUANTITATIVO DEL FACTOR VON WILLEBRAND (VWF) LIBERADO DE CULTIVOS DE HUVEC. AMARAL, MARÍA MARTA; POWAZNIAK, YANINA; FARIÁS, CRISTINA; VERA, EZEQUIEL; KEMPFER, ANA CATALINA; LAZZARI, MARÍA ANGELA

Instituto de Investigaciones Hematológicas «Mariano R. Castex»

En cultivos de HUVEC la concentración de VWF liberado constitutivamente y almacenado en los cuerpos de Weibel-Palade (CWP) disminuye a partir del tercer pasaje celular (PC) (Lopes, 2001). Esto indicaría variaciones cuantitativas en las vías constitutiva y regulada. También existe un aumento del número de los CWP en el segundo PC y una disminución en el tercero (Kiyonaga, 2001). Estas variaciones cuantitativas implícitamente reflejan variaciones cualitativas celulares. Una de las posibles alteraciones cualitativas estaría vinculada con el contenido de las vesículas constitutivas; dado que el pro-VWF (propéptido unido al VWF) se detecta en la vía constitutiva, si existe una variación en su concentración respecto al VWF, interferirá o dejará de interferir sobre el enlace del VWF con el FVIII ($r = \%VWF: FVIII B / \%VWF: Ag$). Estudiamos el VWF liberado de cultivos en los tres primeros PC (n=8) mediante la determinación de: VWF: Ag y el r por ELISA. La relación de pro-VWF/ VWF se analizó por SDS-PAGE (condiciones reducidas), transferencia a nitrocelulosa y detección inmunoenzimática. Por densitometría se obtuvieron las intensidades relativas del monómero de pro-VWF y del monómero de VWF. Los resultados se observan en la Tabla. La comparación de las variables entre los PC indicó que sólo existen diferencias significativas para el VWF: Ag entre el primer y tercer PC ($p=0.034$) y entre el segundo y el tercero ($p=0.009$).

PC	VWF:Ag(ng/millón cels)	r	pro-VWF/VWF
1	180±70	1,13±36	0,28±0,17
2	205±70	0,98±0,15	0,16±0,08
3	112±40	1,01±0,37	0,22±0,16

Las variables cualitativas elegidas no acompañaron a las variaciones cuantitativas del VWF liberado de la vía constitutiva en los pasajes celulares analizados.

398. (7555) PREDICCIÓN DE VALORES DEL HEMOGRAMA BASADO EN DEPENDENCIAS DE LARGA DURACIÓN. LEDESMA, A; RAPACIOLI, M; FLORES, V; D'ATELLIS, C

Dpto. Física-Matemática, Fac. Ingeniería, Univ. Nac. La Plata; Grupo Interdisciplinario de Biología Teórica Dpto Cs Bioestructurales Dpto Matemática Univ Favaloro

Las fluctuaciones en la concentración de células sanguíneas reflejan la dinámica del sistema hematopoyético. El valor de cada parámetro del hemograma (h) es resultado de influencias que operan en la generación, vida media y remoción de células. Esto imprime al h marcada variabilidad temporal. El h es un elemento clave en el análisis de la evolución y pronóstico de enfermedades humanas. El diseño de un modelo con capacidad de predecir el rango de los valores futuros de series del h podría ser de importancia médica. En un trabajo previo analizamos la variabilidad del hemograma como proceso estocástico. Se caracterizó un espectro de potencias del tipo $1/f$, dependencias de larga duración e independencia de escala. Ello sugiere que los procesos biológicos subyacentes operan en una red de interacciones cuyos patrones temporales imprimen dependencias de larga duración al h. Postulamos que es posible realizar predicciones, al menos en el rango temporal determinado por las dependencias de larga duración. Este trabajo presenta un método para predecir día a día los valores de hematocrito de secuencias empíricas en el marco de procesos fARIMA. También se presenta una modificación del método para predecir valores a una cierta distancia (T) a partir de las predicciones día a día. Los datos usados en este trabajo fueron registrados diariamente durante 1024 días en dos ovejas macho de 2 años de edad. Los resultados muestran que los métodos aplicados permiten predicciones de valores futuros que reproducen adecuadamente la secuencia original. Las secuencias que se predicen corresponden adecuadamente con las fluctuaciones de baja frecuencia de las secuencias originales aún con un $T = 30$ días. El error cuadrático medio oscila entre 2.5 y 4.5%. El análisis matemático de la variabilidad del hemograma es una estrategia apropiada para caracterizar su dinámica temporal. Si esta caracterización es posible, la detección de desviaciones patológicas incipientes o la restaura-

ción de una dinámica normal a partir de una previamente alterada podrían ser factibles.

399. (7566) REGULACIÓN DE LA MEGACARIOCITOPOYESIS POR MONOCITOS. D'ATRI, LP; NEGROTTO, S; POZNER, RG; LANDONI, V; ISTURIZ, M; GOMEZ, RM (1); LAZZARI, MA; SCHATNER, M

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (1) Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata

Recientemente se demostró, en un modelo murino, que la eliminación de macrófagos promueve la megacariocitopoyesis. En este trabajo evaluamos esta regulación en células humanas. Se cultivaron células CD34+ de cordón umbilical en transwells sobre monocitos (Mo) de sangre periférica en presencia de trombopoyetina (TPO 25 ng/ml). Luego de 10 días se realizó un recuento celular y se evaluó la frecuencia de megacariocitos (Ms), Mo, células indiferenciadas y linfocitos T (CD61, 14, 34 y 3 respectivamente) por citometría de flujo. A partir de estos valores se obtuvo el número total de cada subpoblación (tabla, $X \pm ESM \times 10(3)$ de 3-4 exp, * $p < 0.05$ vs control (TPO sola). La presencia de Mo aumentó la proliferación de células totales. La generación de Ms fue menor debido a una menor frecuencia de células CD61+ (60 ± 5 vs $10 \pm 4^*$). Contrariamente, el incremento de células CD14+ (6 ± 0.7 vs $31 \pm 5^*$), contribuyó al aumento de Mo totales. Las poblaciones CD34+ o CD3+ fueron similares en valor absoluto (con una menor frecuencia relativa). Las CD34+ cultivadas en medio condicionado de Mo (McMo) también generaron menos Ms y más Mo debido a cambios en las frecuencias de CD61 y 14 sin modificaciones en la proliferación total. El cultivo de células CD34+ con TPO 25 ng/ml+GM-CSF 100 ng/ml proliferó más respecto a TPO sola. Aunque la frecuencia de Ms fue menor (61 ± 7 vs $23 \pm 7^*$), el número total de Ms no mostró diferencias significativas. En cambio, los Mo mostraron un aumento tanto en número como en frecuencia (11 ± 4 vs $39 \pm 4^*$).

	Células totales	Ms totales	Mo totales
Transwells	140±15vs325±38*	81±2vs30±7*	9±2vs96±3*
McMo	161±11vs133±11	114±9vs46±15*	8±1vs42±7*
TPO+GM-CSF	110±25vs275±10*	70±22vs87±39	11±3vs107±13*

Los Mo regulan negativamente la producción de Ms a través de factores solubles que favorecen entre otros la generación de Mo.

400. (7690) ALTERACIONES GENÉTICAS DEL FACTOR VON WILLEBRAND EN 22 MIEMBROS DE UNA FAMILIA ARGENTINA. CARBALLO, GONZALO AUGUSTO; WOODS, ADRIANA INÉS; VERA, EZEQUIEL; CASAIS, PATRICIA; ALETTI, GUSTAVO; FARIAS, CRISTINA; KEMPFER, ANA CATALINA; LAZZARI, MARÍA ANGELA

Instituto de Investigaciones Hematológicas «Mariano R. Castex»

De acuerdo a la herencia recesiva de la enfermedad de von Willebrand 2N (VWD 2N) los individuos heterocigotas son generalmente asintomáticos; los homocigotas y heterocigotas compuestos muestran un fenotipo similar a la hemofilia A (HA). La mutación R854Q es la más frecuente, con sangrado más leve. Una paciente con hemorragia mayor post cirugías en 2 ocasiones más sangrado mucocutáneo, con antecedente familiar de HA leve, concurre a control intra embarazo (4 meses). Se le realizaron estudios de coagulación orientados en la búsqueda de VWD 2N. Laboratorio (único estudio): FVIII: 70 U/dL, VWF:Ag: 95 U/dL, VWF:RCo: 82 U/dL, VWF:FVIII B: disminuido. Se secuenciaron los exones 18 al 24 del gen del VWF. Se encontró la mutación heterocigota R854Q. Se re-evaluó el diagnóstico familiar de HA estudiando la presencia de R854Q en 22 individuos (3 generaciones). Se encontraron 5 individuos heterocigotas para la R854Q: madre: hemorragia post parto, equimosis y

menometrorragia; dos hermanos varones: sin síntomas; un hijo con hematomas y VWF:FVIII disminuido. No se encontró la mutación en: una hija con síntomas y FVIII, VWF:Ag y VWF:RCo en el límite inferior normal y VWF:FVIII disminuido; un hijo sin síntomas, con FVIII, VWF:Ag, VWF:RCo y VWF:FVIII normales; un hermano sin síntomas; 3 primos varones con FVIII entre 12 y 23 U/dL, 2 de ellos con VWF:FVIII disminuido; una prima sin síntomas; ocho sobrinos (uno de ellos con síntomas clínicos y FVIII de 5 U/dL) y 2 hermanas de su madre. Se halló la mutación R854Q en 5 de 22 individuos de una familia, con una penetrancia de 22,7%. Un 60% de los pacientes referidos heterocigotas para la R854Q tiene síntomas clínicos. Se deberá orientar el estudio molecular hacia la búsqueda de HA y otras mutaciones para VWD 2N ya que no podemos descartar que los familiares con el FVIII y VWF:FVIII disminuidos puedan tener otra mutación responsable de los síntomas clínicos y de los niveles bajos de FVIII.

401. (7746) INFLUENCIA DEL FIBRINÓGENO Y COLESTEROL PLASMÁTICO SOBRE EL COMPORTAMIENTO FLUIDO DE LA SANGRE EN RATAS TRATADAS CON ALUMINIO Y HEPATECTOMIZADAS. CONTINI, MARÍA DEL CARMEN; BAZZONI, GRACIELA(1); HERNÁNDEZ, GLADIS(1); MAHIEU, STELLA; GONZÁLEZ, MARCELA; BERNAL, CLAUDIO; CARNOVALE, CRISTINA(2)

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL; (1) Facultad de Cs. Médicas.(2) Fac.de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR

La composición proteica y lipídica del plasma influyen sobre la viscosidad plasmática (vp) y sobre el comportamiento en el flujo de los glóbulos rojos. En este trabajo se estudió la influencia del fibrinógeno (Fb) sobre la vp y del colesterol plasmático (Co) sobre la deformabilidad de los eritrocitos provenientes de ratas aluminizadas y hepatectomizadas. Ratas Wistar machos adultos fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos experimentales (n=5 cada uno): I) sometidas a cirugía simulada (SH); II) hepatectomizadas (remoción 65% del hígado)(HP); III) SH tratadas con Al (OH)3 80 mg/kgPC i.p. 3 veces por semana durante 3 meses (SHA); IV) HP tratadas con Al de igual manera (HPAl). Se trabajó 48 horas después de la cirugía. En sangre se determinó: Co por método enzimático-colorimétrico, Fb por turbidimetría, hematocrito (Hto) por micrométodo, vp y viscosidad sanguínea (vs) con un viscosímetro Brookfield cono-plato a 230 s-1. Se calculó la vs relativa corregida a Hto 40% (vc: medida indirecta de la deformabilidad eritrocitaria). Análisis estadístico: ANOVA de una vía, seguido por test de Tukey (* p< 0,05 vs SH) y el coeficiente de correlación de Spearman. Resultados expresados como la media ± ESM.Co (mg/dl): I) 64,5± 1,5 ;II)47,3± 3,7*;III)54± 4,9*; IV)47,3± 3,7*. Fb (mg/dl) I)128,8± 8,3; II)216,7± 38,1*; III)197,0± 21,2* ;IV)245,0± 30,5*. vp (centipoise) I)1,43± 0,08;II)1,58± 0,05*;III)1,67± 0,03*; IV)1,53± 0,03*.vc I)3,96± 0,07;II)5,18± 0,28*;III)4,52± 0,09*; IV)10,7± 0,61*. Los resultados demuestran que la remoción hepática y/o la presencia de aluminio provocan: disminución del Co asociada al aumento de rigidez de los glóbulos rojos (incremento de vc) (rs = -0,616; p<0,025, n=13) y aumento del Fb plasmático, que presenta una asociación directa con el incremento de vp (rs= 0,58; p<0,023, n=15), evidenciando que el Fb es el factor principal implicado en la variación de vp.

402. (7788) GRADO DE ORDENAMIENTO DE LA BICAPA LIPÍDICA DE ERITROCITOS DE RATAS TRATADAS CON ALUMINIO (AL) Y HEPATECTOMIZADAS (HP). CONTINI, MARÍA DEL CARMEN ADA; GENNARO, ANA MARÍA(1); GONZÁLEZ, MARCELA; MAHIEU, STELLA; BERNAL, CLAUDIO; CARNOVALE, CRISTINA(2)

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.UNL; (1)INTEC-CONICET-UNL.(2) Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas.UNR

Con el objetivo de caracterizar el/los mecanismos por los cuales se produce la rigidización de los glóbulos rojos en ratas

tratadas con Al y HP, se estudió la fluidez de la membrana eritrocitaria. Se utilizaron 4 grupos de ratas Wistar macho adultas (n=4 c/u): I)Sh (sham con cirugía simulada), II)HP (hepatectomía del 65%, estudiadas 48hs.post-cirugía), III)Al-Sh (tratadas con Al(OH)3 80mg/Kg de P.C., inyectadas 3 veces /semana durante 3 meses y cirugía sham) y IV) Al-HP (tratadas con Al y hepatectomizadas). Se extrajo sangre anticoagulada con heparina. A los eritrocitos lavados con PBS se les incorporaron los marcadores de espín liposolubles ácidos 5-, 12- o 16- doxil- esteáricos (5d, 12d o 16d) incubándolos 30 min a temperatura ambiente. Esta marcación permite sensar el grado de ordenamiento de las cadenas acílicas a distintas profundidades de la bicapa lipídica mediante espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR). De los espectros registrados se determinó el parámetro de orden (S) para cada muestra y cada marcador. Resultados expresados como media ±ESM.S5d: I) 0.667 ± 0.004; II) 0.683 ± 0.003; III) 0.680 ± 0.002; IV) 0.679 ± 0.004. S12d: I) 0.544 ± 0.003; II) 0.532 ± 0.007; III) 0.560* ± 0.005; IV) 0.527* ± 0.004. S16d: I) 0.236 ± 0.003; II) 0.232 ± 0.005; III) 0.221 ± 0.001; IV) 0.220±0.01. * p< 0,05 vs. Sh (U de Mann Whitney). Se observa un aumento de S12d (disminución de fluidez) para Al-Sh vs Sh, y una disminución de S12d (aumento de fluidez) para Al-HP vs Sh, el Al acompañaría la rigidización eritrocitaria observada en estudios previos para HP y Al. En el grupo Al-HP la disminución de S12 indicaría que HP tiende a fluidificar la bicapa lipídica, revertiendo la rigidización causada por el tratamiento con Al y disminuyendo el ordenamiento de las cadenas acílicas. Esto sugiere que la rigidización eritrocitaria causada por HP no estaría vinculada al comportamiento de la bicapa lipídica.

403. (7799) CAMBIOS DE VOLUMEN Y FORMA DE LOS ERITROCITOS DE RATAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS CON TRYPANOSOMA CRUZI. BERRA, HÉCTOR HUGO; REVELLI, SILVIA (1); LUQUITA, ALEJANDRA (2)

Cát. Fisiología Humana e Inst. Inmunología, Fac. Cs. Médicas. Universidad Nacional de Rosario. 1. Inst. Inmunología, 2. Cát. Biofísica. Fac. Cs. Médicas U.N.R.

La infección con *Trypanosoma cruzi* (Tc) produce cambios que generan hiperviscosidad sanguínea, constituyendo un factor de riesgo isquémico microcirculatorio. En ratas experimentalmente infectadas con T. cruzi, se halló previamente, un descenso de la fluidez sanguínea a expensas de un incremento del volumen de los eritrocitos (E) (Medicina 60 (5/2): 790, 2000). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la forma de los E y la osmolaridad plasmática (OP) en dicho modelo. Se utilizaron machos, de línea «I» infectados al destete por vía subcutánea con 106 tripomastigotes de la cepa Tulahuén. A los 7 (GA) y 14 días (GB) postinfección (p.i.) y a un grupo de controles (GC) se les midió la viscosidad sanguínea (hs), el volumen corpuscular medio (VCM), se analizó la morfología de los E por microscopía electrónica, determinándose el porcentaje de las distintas formas utilizando la clasificación de Besis y se midió la OP. En el GB, la hs (4.07 + 0.58 mPa.s) y el VCM (64.05 + 8.00 m3) (media + d.s.) fueron significativamente mayores que en el GA (3.58 + 0.45; 58.90 + 7.98) y el GC (3.63 + 0.46; 58.54 + 10.80), p<0.05, respectivamente. En GA y GB se halló una transformación en estomatocitos tipo I (GA: 27,77 + 6,41 y GB: 29,57 + 4,34 % respectivamente) y equinocitos (GA: 22,4 + 8,76 y GB: 34,51 + 1,11%, p<0.05). La OP no mostró diferencias significativas entre los 3 grupos. En la etapa aguda de la infección experimental con Tc en ratas, los aumentos del VCM y del porcentaje de E no-discocitos incrementarían la hs y el VCM no parece relacionarse con modificaciones de la OP.

404. (7847) DISTRIBUCIÓN DE HIERRO EN PLASMA: FE-UNIDO Y NO UNIDO A TRANSFERRINA. CARDOSO, NANCY; ALCALDE, MYRIAM; GALLEANO, MONICA

Fisicoquímica- PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El objetivo de este trabajo fue estudiar factores que afectan la distribución de Fe en plasma en términos Fe-unido a transferrina (Fe-UT) y Fe-No unido a transferrina (Fe-NUT). Se han descrito dos mecanismos responsables de la aparición de Fe-NUT: a) incremento en la cantidad de Fe total y b) movilización del Fe-UT. Estos procesos se estudiaron a través de dos modelos experimentales en ratas Sprague Dawley adultas a) hierro parenteral (200 mg/kg, ip, 6 h) y b) endotoxemia (LPS, 4 mg/kg, ip, 6h). El plasma fue estudiado a través de determinaciones de resonancia paramagnética electrónica (EPR) a baja temperatura donde la señal con $g=4,3$ fue asignada a Fe-UT. El Fe-NUT fue determinado a través del test de bleomicina. Plasmas de ratas controles presentaron $45\pm6\%$ de saturación de transferrina (ST) y el Fe-NUT fue detectable sólo en el 50 % de las muestras, siendo el valor encontrado de 1.2 ± 0.5 uM. En el plasma de las ratas sobrecargadas in vivo con Fe, ST se incrementó a $88\pm12\%$ y el Fe-NUT fue de 12 ± 2 uM. En el plasma de las ratas sometidas a endotoxemia los valores de ST fueron de $37\pm8\%$ y Fe-NUT no fue detectable. Cuando el plasma fue incubado in vitro con un sistema generador de peroxinitrito (SIN-1; 0-500 uM) la señal correspondiente a Fe-UT disminuyó de forma dosis y tiempo dependiente y sufrió una marcada distorsión. Apotransferrina purificada fue utilizada para estudiar modificaciones en residuos susceptibles de ser atacados por peroxinitrito. La incubación in vitro con 100 uM SIN-1 durante 30 min produjo una disminución significativa del $72\pm6\%$ ($p<0,05$) en la fluorescencia adjudicada al triptofano. Los resultados sugieren que bajo nuestras condiciones experimentales a) el hierro no unido a transferrina fue eficientemente detectado a altos valores de ST ($>80\%$) y b) en condiciones de estrés nitrosativo la estructura de la transferrina se vería afectada. Este trabajo fue financiado por la Universidad de Buenos Aires y el CONICET

INMUNOLOGÍA 5: INMUNOBIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

405. (6686) LOS GLUCOCORTICOIDES (GC) INTERACTUAN DE FORMA DIFERENCIAL CON LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (FT) T-BET (TH1) Y GATA-3 (TH2) CLAVES PARA LA POLARIZACIÓN DEL LINFOCITO T DE AYUDA (LTH). LIBERMAN, ANA CLARA; REFOJO, DAMIAN; ARZT, EDUARDO

Lab. de Fisiología y Biología Molecular. Dept. de Fisiol, Biol Mol y Cel, FCEN, UBA. lfybine-CONICET

Hemos demostrado que los GC inhiben la expresión de los FT GATA-3 (Th2) y T-bet (Th1) claves en la diferenciación Th. Los GC también inhiben la actividad transcripcional de estos FT, usando como reporteros de su actividad al promotor de IL-5 regulado por GATA-3 y al promotor de IFN- γ (regulado por T-bet) río arriba del gen de la luciferasa. Esta inhibición es mayor para T-bet que para GATA-3 (50% vs 20% de inhibición respectivamente, $p<0.01$). Además, cuanto mayor es la expresión de T-bet mayor la inhibición de su actividad, pero cuanto mayor es la expresión de GATA-3, menor resulta la inhibición por GC. Esto indicaría un rol favorecedor de los GC hacia el linaje Th2. Utilizando un gen reportero con sitios de pegado a GATA-3, vimos que los GC inhiben la actividad de este FT sobre sus elementos respondedores (inhibición= 40% , $p<0.01$), pudiendo ser esta la vía por la cual los GC estarían inhibiendo la actividad de GATA-3 sobre el promotor de IL-5. Asimismo encontramos que los GC inhiben la actividad de GATA-3 sobre su promotor (inhibición= 50% , $p<0.01$), limitando el efecto autorregulatorio de GATA-3. La citoquina pro-inflamatoria temprana, IL-1 β , que posee un rol diferenciador Th1, sensibiliza a T-bet a la inhibición por GC y carece de efecto sobre GATA-3, favoreciendo, el desarrollo del linaje Th2. Para ahondar en el mecanismo molecular implicado en la inhibición por GC de la actividad de estos FT, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación entre GATA-3/T-bet con el receptor a GC (GR). Vimos que GATA-3 no interactúa con GR, mientras que T-bet sí lo hace. Concluimos que los GC favore-

cen el desarrollo de una respuesta Th2 a través de una inhibición diferencial de GATA-3 y T-bet. Este último es más sensible a la inhibición que GATA-3, posiblemente por el secuestro por GR de T-bet vía interacción proteína-proteína.

406. (7181) EXPRESSION OF THE ZFHEP GENE DURING LYMPHOPOIESIS. CABANILLAS, ANA MARIA; DOAN, LORETTA (1); GRIMES, H-LEE (1); DARLING, DOUGLAS (1)

CIBICI-CONICET. Dpto Bioquímica Clínica- Fac. CCQQ. U N Córdoba; (1) Biochemical & Molecular Biology Dpmnt, University Of Louisville Medical Sch, Usa.

T lymphocytes are derived in the thymus from common lymphoid precursor cells (CLP) by a stepwise developmental pathway, from double negative cells (DN1 to DN4), to the double positive (DP) stage and finally to single positive (SP) CD4- CD8+ cytotoxic T cells or CD4+ CD8- helper T cells. Zfhep is a transcription factor, mutation of which causes perinatal lethality, defects of skeletal patterning and severe T cell deficiency. Zfhep seems to be essential for differentiation of a very early T cell precursor, but there is no direct assessment of Zfhep expression during thymocyte (THY) development. The aim of this project is to define the pattern of expression of Zfhep during T cell differentiation and the regulatory elements in the Zfhep promoter. Zfhep expression of sorted DN, DP, CD4+ and CD8+ SP mice THY was assessed by western blot (WB) and intranuclear flow cytometry (IFC) with surface staining for CD4/CD8 and CD44/CD25 (to sort DN population). The human Zfhep promoter was cloned and several 5' deletions were made. Promoter-luciferase plasmids and CMV β -gal (to normalize transfection efficiency) were transfected into Jurkat cells by Fugene6. Data are expressed as activation relative to control vector (C). We found that Zfhep is expressed in total THY; WB and IFC showed that sorted DP THY clearly express more Zfhep than CD8+ or CD4+ SP cells. Zfhep increased between the DN1 and DN2 cells; DN3 and DN4 populations also had a high level of expression. Maximal gene activity was observed within the first 212 bases of the promoter (93 fold vs. C). The activity of bigger constructs of promoter was lower (30 fold vs. C). We localized a G-rich segment in bases -9 to -53 that is strictly required for activity. Zfhep shows a regulated expression during lymphopoiesis. A high expression of Zfhep in DN2-4 and DP thymocytes is compatible with a role of Zfhep in the control of early steps of thymocyte differentiation. Transfection studies have localized two different regulatory regions of the Zfhep promoter in T lymphocytes.

407. (7225) PRODUCCION DE IL-6 POR MACROFAGOS PERITONEALES ESTIMULADOS CON ANTÍGENOS SOLUBLE Y PARTICULADO. EFECTO SOBRE LA SINTESIS DE IGG ASIMÉTRICAS. APICELLA, CAROLINA; NOVOA, LUCIA; MIRANDA, SILVIA; DOKMETJIAN, JOSÉ; SARCHI, INES(1); GENTILE, TERESA; MARGNI, RICARDO

Cátedra de Inmunología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. IDEHU (CONICET). (1)Cát. de Matemática, FFYB, UBA

La inmunización a repetición con antígenos particulados induce una respuesta inmune humoral con alta proporción de moléculas de IgG asimétricas. Considerando que la IL-6 incrementa la síntesis de este tipo de moléculas, se analizó el efecto de la estimulación con antígenos particulados y solubles sobre el nivel de IL-6 e IL-10 secretadas por macrófagos peritoneales (MP) y su incidencia en la producción de IgG asimétricas. Los MP se obtuvieron de hembras Balb/c en condiciones no inflamatorias y fueron cultivados a 37°C en 5% de CO_2 . A las 2 hs, las células no adherentes fueron removidas. Las adherentes -analizadas por inmunohistoquímica con Ac. anti F4/80- fueron estimuladas con partículas de látex de $4,5 \mu\text{m}$ sensibilizadas con ovoalbúmina-ovo-(0.2, 1.0 y $5.0 \mu\text{g/ml}$) o con ovo soluble en iguales concentraciones. Luego de 24 hs se determinó por ELISA la concentración de IL-6 e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo (SC). Posteriormente, células de hibridoma productoras de IgG asimétricas

fueron cultivadas en medio conteniendo 50% de los SC de MP. Los resultados muestran que la estimulación de los MP con diferentes concentraciones de antígeno tanto soluble como particulado, incrementa la secreción de IL-6 respecto del control sin estímulo ($p < 0.01$) y que ovo-látex produce en las tres concentraciones utilizadas mayores niveles de IL-6 respecto del estímulo con ovo soluble (1.07; 1.58; 2.53; vs 0.50; 0.77; 0.79 ng/ml. $p < 0.01$). En todos los casos la concentración de IL-10 fue menor a 0.31 ng/ml. Sólo se produjo un aumento significativo en la producción de IgG asimétricas respecto del control al estimular cultivos de hibridomas, con el SC de MP obtenidos luego del agregado de ovo-látex 5 $\mu\text{g/ml}$ (108%; $p < 0.05$). Estos resultados indicarían que el incremento de la proporción de IgG asimétricas estaría mediado al menos por IL-6, producida por MP en respuesta a la estimulación con antígenos particulados. (UBA B094).

408. (7306) ASOCIACIÓN DE c-FOS CON RETÍCULO ENDOPLÁSMICO A TIEMPOS TARDÍOS POST-ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS. ANDREANI, VIRGINIA; MACCIONI, MARIANA

Depto. Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. CIBICI-CONICET

Las funciones que se le asignan a c-Fos están relacionadas con la regulación de la expresión de genes, formando parte del factor de transcripción AP1, junto con c-Jun. Ambos son rápida y transitoriamente expresados después de la activación de una célula T y cumplen un papel fundamental en la activación del gen de IL2. Se ha demostrado, en algunos tipos celulares, que c-Fos activa la síntesis de fosfolípidos a través de un mecanismo independiente de su actividad genómica, asociándose a retículo endoplásmico (RE), principal sitio de síntesis de estos componentes de membrana (Bussolino et al., 2001; Gil et al., 2004). El objetivo de este trabajo es investigar la localización subcelular de c-Fos a tiempos tempranos y tardíos post estimulación (p.e) en células del Sistema Inmune, para analizar si en las mismas también puede estar ejerciendo dicha función dual. Para ello células mononucleares de bazo de rata fueron estimuladas con Con A. Se estudiaron cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales, marcadores de activación y análisis de ciclo celular (citometría de flujo, RT-PCR) y la localización subcelular de c-Fos (microscopía confocal) a distintos tiempos p.e. Demostramos que el ARNm de IL2 se expresa a los 60 min p.e, mientras que los marcadores de activación CD71 y CD25 se detectan a las 20h p.e. El inicio de la síntesis de ADN junto con el aumento en el tamaño celular y en la complejidad del citoplasma también se manifiestan a partir de las 20h p.e.; y así los eventos proliferativos que comienzan a ser evidentes a las 48h p.e. La presencia del dímero c-Fos/c-Jun en núcleo se evidencia tempranamente p.e., mientras que en tiempos posteriores a los 60 min se observa la presencia y permanencia de c-Fos en citoplasma, colocalizando con RE a tiempos tan tardíos como 48-72h p.e. Nuestros resultados sugieren que c-Fos podría estar cumpliendo una función independiente de su actividad nuclear y de c-Jun, asociándose a RE en tiempos tardíos p.e y previos a la proliferación celular, tal como se ha demostrado en otros sistemas.

409. (7452) IMPACTO DE GALECTINA-1, UN NUEVO MEDIADOR DEL ESCAPE TUMORAL, SOBRE LA FISIOLÓGIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS Y MURINAS. ILARREGUI, JUAN MARTÍN; VERMEULEN, MÓNICA; TOSCANO, MARTA ALICIA; RUBINSTEIN, NATALIA; BIANCO, GERMÁN ARIEL; GEFFNER, JORGE; RABINOVICH, GABRIEL ADRIÁN

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas «José de San Martín», Facultad de Medicina, UBA.; IIHEMA, Academia Nacional de Medicina

Recientemente demostramos la contribución de Galectina-1 (Gal-1) a fenómenos de evasión de la respuesta inmune antitumoral. En el presente estudio exploramos los efectos de Gal-1 sobre la diferenciación y maduración de células dendríticas hu-

manas (CDh) y murinas (CDm). Las CDh se obtuvieron por diferenciación de monocitos en presencia de IL-4 y GM-CSF durante 7 días y posterior maduración por LPS. Las CDm se obtuvieron de precursores de médula ósea de ratones C57BL por tratamiento con GM-CSF por 9 días. Se observó una capacidad diferencial de Gal-1 de unirse a monocitos, CDh inmaduras y CDh maduras. La incorporación de Gal-1 al inicio del cultivo (0,04, 4 y 40 $\mu\text{g/ml}$) inhibió la diferenciación de CDh y CDm monitoreada en función del porcentaje de células positivas para CD1a y CD11c, respectivamente ($p < 0,05$). La evaluación funcional reflejó una inhibición de la endocitosis de OVA-FITC en CDh diferenciadas en presencia de Gal-1 ($p < 0,05$) y una marcada inhibición de la capacidad de CDh ($80 \pm 12\%$) y CDm ($85 \pm 8\%$) de estimular la respuesta proliferativa linfocitaria alogénea. El añadido de Gal-1 a CDh ya diferenciadas y expuestas a LPS inhibió su capacidad de inducir la respuesta alogénea ($p < 0,05$) y produjo un drástico bloqueo en la producción de IL-12 ($33,2 \text{ pg/ml}$ vs $3,1 \text{ pg/ml}$). Experiencias in vivo: CDm diferenciadas en presencia o ausencia de Gal-1 fueron pulsadas con OVA e inyectadas i.v. en ratones singéneos. Diez días después se evaluó la respuesta proliferativa antígeno-específica en esplenocitos, observándose una respuesta significativamente menor ($p < 0,001$) en aquellos provenientes de ratones inyectados con CDm/Gal-1. Finalmente, se exploraron posibles mecanismos involucrados en los efectos descriptos. El presente estudio define un nuevo mecanismo a través del cual Gal-1 podría contribuir al fenómeno de escape tumoral.

410. (7781) ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS HUMANOS POR ACIDOSIS EXTRACELULAR: SU DEPENDENCIA RESPECTO DE LA ACTIVACIÓN DE LA FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASA (PI3K). MARTÍNEZ, DIEGO (1); TREVANI, ANALÍA (1); VERMEULEN, MÓNICA (1); ÁLVAREZ, MARÍA EUGENIA (1); GAMBERALE, ROMINA (1); SALAMONE, GABRIELA (1); TANOS, TAMARA (2); COSO, OMAR (2); GEFFNER, JORGE (1)

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina; (2) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA)

Previamente hemos demostrado que la acidosis extracelular induce la activación de neutrófilos humanos. En el presente trabajo analizamos las vías de señalización involucradas. Los neutrófilos humanos fueron purificados por técnicas convencionales. La activación de PI3K y ERK1/2 se evaluó por Western Blot. Como medida de activación de los neutrófilos evaluamos su cambio de forma, analizando los cambios en los valores de forward side scatter (FSC) por citometría de flujo. Los neutrófilos fueron suspendidos en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 1% de suero fetal bovino e incubados a una concentración de $10(7)$ células/ml a $37(0)^\circ\text{C}$, durante 1 a 60 minutos, a pH 7.3 o pH 6.5. Observamos por Western Blot, en aquellos neutrófilos cultivados a pH ácido, un notorio incremento en la fosforilación de MAPK ERK 1/2 y Akt, sugiriendo esta última observación activación de la vía de señalización dependiente de PI3K. Los máximos niveles de fosforilación fueron observados, para ambas vías, a los 2-5 minutos de incubación. Con el objeto de determinar si alguna de estas vías era responsable de la activación de los neutrófilos inducida por acidosis, empleamos los compuestos PD 98059 (5 mM), inhibidor de la vía MEK1/ERK y Wortmanina (100 nM), inhibidor de PI3K. Los neutrófilos cultivados a pH 6.5 experimentaron un dramático incremento en sus valores de FSC a los 5 min de cultivo (333 ± 27 vs 544 ± 30 , media \pm ES, $n=6$, $p < 0.01$, para neutrófilos cultivados a pH 7.3 y 6.5, respectivamente). El tratamiento de los neutrófilos con PD 98059 no induce efecto inhibitorio sobre el incremento en los valores de FSC inducidos por acidosis, mientras que Wortmanina los suprimió completamente (% inhibición > 90 , $n=6$). Los resultados presentados sugieren la participación de PI3K en la activación de neutrófilos por acidosis extracelular.

411. (7790) IMPACTO DE LA ACIDOSIS EXTRACELULAR EN LA FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS. MARTÍNEZ, DIEGO; VERMEULEN, MÓNICA;

GAMBERALE, ROMINA; TREVANI, ANALÍA; CEBALLOS, ANA; SABATTE, JUAN; IGUAIN, ANA PAULA; GIORDANO, MIRTA; GEFFNER, JORGE

IIHEMA, Academia Nacional De Medicina; Dto Microbiología, Facultad De Medicina, UBA.

Previamente demostramos que las células dendríticas murinas (CDm), diferenciadas a partir de precursores presentes en médula ósea por acción del GM-CSF, se activaban por exposición a valores ácidos de pH extracelular (pH 6.5) mostrando: incremento en su actividad endocítica, aumento en la expresión de MHC clase II, CD40 y CD86 y aumento en su capacidad de inducir respuestas T CD8 citotóxicas, al ser transferidas a ratones no inmunes. En la presente comunicación examinamos si la acidosis extracelular era también capaz de inducir la activación de células dendríticas humanas (CDh) obtenidas por diferenciación de monocitos por acción de IL-4 + GM-CSF. A diferencia de los observado en CDm, el cultivo de las CDh (3, 18 y 36 hs a 37°C) a valores ácidos de pH extracelular (pH = 6.5) no indujo modificaciones en la expresión de MHC clase II, CD40 o CD86. Sí observamos un notorio incremento en la endocitosis de ovalbúmina marcada con FITC (OVA-FITC), al realizar el ensayo a pH 6.5, respecto de lo observado a pH 7.3: % incremento = 284 ± 37 , media \pm ES, n=6, $p < 0.01$. Resultados similares se observaron al valorar la endocitosis de peróxido de rábano (HRP) a pH 7.3 vs pH 6.5. Observamos, por otra parte, que el cultivo de las CDh a pH 6.5 durante 36 hs indujo un notorio incremento en la producción de IL-12, valorada tanto por marcación intracelular y citometría de flujo (% células positivas: 29 ± 9 vs 6 ± 4 , media \pm ES, n=6, pH 6.5 vs 7.3, $P < 0.01$) como también por ELISA, en los sobrenadantes de cultivo ($p < 0.001$, pH 6.5 vs 7.3). En contraste con lo observado para IL-12, no detectamos incremento en la producción de TNF-alfa, GM-CSF, interferón-gamma o IL-10, al cultivar las CDh en condiciones de acidosis. La acidosis extracelular, propia a diferentes fenómenos inflamatorios en tejidos periféricos podría, merced a la estimulación de la producción de IL-12, favorecer la diferenciación de los linfocitos TCD4+ en un perfil TH1.

412. (7791) PERFIL DE CITOQUINAS INDUCIDO EN CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS POR ACIDOSIS EXTRACELULAR. VERMEULEN, MÓNICA; MARTÍNEZ, DIEGO; GAMBERALE, ROMINA; TREVANI, ANALÍA; ÁLVAREZ, EUGENIA; SALAMONE, GABRIELA; NAHMOD, KAREN; GRASSI BASINO, ALEJANDRA; GEFFNER, JORGE

IIHEMA, Academia Nacional De Medicina; Dto Microbiología, Facultad De Medicina, UBA.

Previamente demostramos que el pH ácido modula la fisiología de las células dendríticas murinas inmaduras (CDm). En este sentido encontramos que aumenta la capacidad endocítica, la presentación antigénica a través de MHC I, y en consecuencia, las respuestas TCD8+ citotóxicas in vivo. Este último resultado sugeriría que el pulsado de las CDm en condiciones de acidosis favorecería el posterior desarrollo de respuestas de perfil TH1. A fin de examinar esta hipótesis analizamos, en CDm inmaduras obtenidas a partir de precursores de médula ósea por incubación con GM-CSF, si la acidosis extracelular era capaz de inducir la producción de IL-12. Observamos, en CDm cultivadas a pH 6.5 por 18 hs un incremento notorio en la producción de IL-12, valorada por marcación intracelular y citometría de flujo (% células positivas = 15 ± 5 vs 3 ± 2 , pH 6.5 vs 7.3, $P < 0.01$). Atendiendo a nuestras observaciones previas indicando que la acidosis prevenía la apoptosis de CDm inmaduras, examinamos los niveles de producción de GM-CSF, citoquina que ejerce un poderoso efecto antiapoptótico. Encontramos que la acidosis (pH 6.5, 18 hs) estimuló la producción de GM-CSF, valorado por ELISA: 432 ± 108 vs 49 ± 32 pg/ml, media \pm ES, n=4, Ph 6.5 VS 7.3, $P < 0.01$). Por último, examinamos la producción de TNF-alfa (por su acción citotóxica sobre células L929) e IL-6 (por marcación intracelular y citometría de flujo) observando nuevamente una estimulación significativa ($p < 0.01$) a pH 6.5 vs pH 7.3. Nuestras

observaciones sugieren que la acidosis extracelular gatilla en CDm la producción de citoquinas involucradas en: a) inducción de respuestas TH1, b) prevención de la apoptosis y c) inducción de respuesta inflamatoria aguda.

413. (7801) POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA DE NEUTRÓFILOS AL ADN BACTERIANO POR FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACRÓFAGOS (GM-CSF). ALVAREZ, MARÍA EUGENIA; FUXMAN BASS, JUAN; GEFFNER, JORGE; VERMEULEN, MÓNICA; SALAMONE, GABRIELA; MARTÍNEZ, DIEGO; TREVANI, ANALÍA

IIHEMA - Academia Nacional de Medicina

Previamente demostramos que el ADN bacteriano induce la activación de neutrófilos humanos a través de un mecanismo CpG-independiente. Otros estudios confirmaron la incapacidad de los neutrófilos de responder a oligonucleótidos con motivos CpG (ODN CpG), indicando además, en base al empleo de un único ODN, que el pre-tratamiento de los mismos con GM-CSF les confería capacidad de responder a CpG. El objetivo de este trabajo fue reexaminar estos resultados empleando ODN con distintas secuencias para determinar si la respuesta a los mismos es CpG-dependiente. Para ello, evaluamos la producción de IL-8 por neutrófilos pre-tratados por 90 min a 37°C con GM-CSF (50 ng/ml), en respuesta a estimulación con ODN fosfodiéster, fosforotioato, conteniendo tanto motivos CpG, motivos invertidos o carentes de los mismos, así como también con ADN de E coli. Los resultados obtenidos indicaron que el pre-tratamiento con GM-CSF potencia significativamente la producción de IL-8 inducida por ADN bacteriano (272 ± 127 vs 854 ± 156 pg/ml de IL-8, en ausencia o presencia de GM-CSF respectivamente, n=6, $p < 0.01$). Además, el GM-CSF indujo a los neutrófilos a responder a la estimulación con ODN conteniendo o no motivos CpG tanto fosfodiéster como fosforotioato (n=6, $p < 0.01$). Resultados adicionales indicaron que el GM-CSF no incrementa la unión del ADN bacteriano a la superficie celular (n=6). En forma preliminar hemos observado que el GM-CSF incrementa la expresión de IRAK-1, mediador transduccional de los receptores de tipo Toll. En conjunto, estos resultados sugieren que el GM-CSF no confiere a los neutrófilos capacidad de responder específicamente a motivos CpG, pero sí incrementa su respuesta frente a ADN bacteriano. Este efecto no es consecuencia de un incremento en la unión del ADN a la superficie celular y podría deberse a una estabilización de la expresión de alguno/s de los mediadores transduccionales de la vía de los TLR.

414. (7802) CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL ADN BACTERIANO CON NEUTRÓFILOS HUMANOS. FUXMAN BASS, JUAN; ALVAREZ, MARÍA E.; GEFFNER, JORGE; VERMEULEN, MÓNICA; SALAMONE, GABRIELA; MARTINEZ, DIEGO; LONGO, ENRIQUE; TREVANI, ANALÍA

IIHEMA -Academia Nacional de Medicina

Previamente demostramos que el ADN bacteriano induce la activación de neutrófilos a través de un mecanismo CpG-independiente. La activación no está mediada por el TLR9 y parece involucrar a un receptor presente en la membrana celular. En este trabajo hemos caracterizado la unión del ADN a la superficie celular. Para ello los neutrófilos humanos fueron incubados durante 30 min a 4°C con ADN de E coli biotinilado (60 µg/ml) y la unión fue revelada por incubación con avidina-FITC. Nuestros resultados indicaron (1) que el ADN bacteriano se une a la superficie del neutrófilo (n=14; $p < 0.0001$); y (2) que dicha unión es específica, puesto que es desplazada en más de un 85% por un exceso de ADN no marcado (600 µg/ml) y no es desplazada por la adición de un exceso de poli-adenosina (600 µg/ml) o ARN de transferencia de levaduras (600 µg/ml). El 50% de la máxima unión observada fue alcanzado con 50 µg/ml de ADN biotinilado. Experimentos de competencia realizados con ADN genómico biotinilado y fragmentos no biotinilados obtenidos por digestión con DNasa I, indicaron que sólo los fragmentos mayores a 200

bases lograron desplazar la unión del ADN biotinilado a la superficie celular en más del 85% (n=6; p<0,05). El tratamiento de neutrófilos con FMLP (10(-6) M) incrementó más de tres veces la unión del ADN bacteriano a la superficie celular (n=7; p<0,01), sugiriendo la presencia de un depósito intracelular del receptor que se expone en la membrana plasmática en respuesta a estimulación. Además, el pretratamiento de neutrófilos con tripsina y quimotripsina (100 µg/ml) inhibió en más de un 50% el pegado del ADN bacteriano a la superficie celular (n=5; p<0,05). En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de un receptor de naturaleza proteica en la superficie del neutrófilo, cuya expresión se incrementa por activación celular, que podría reconocer una secuencia o estructura sólo expuesta en fragmentos de ADN bacteriano de tamaño superior a 200 bases.

415. (8001) INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE RANTES Y GALECTINA-1 DURANTE LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA ALOGÉNICA LINFOCITARIA. RAMHORST, ROSANNA ELIZABETH; RUBINSTEIN, NATALIA; CORIGLIANO, ADRIANA; FAINBOIM, LEONARDO; RABINOVICH, GABRIEL

Laboratorio de inmunogenética, Htal. De Clínicas «José de San Martín», Bs. As. Argentina

En trabajos previos demostramos la función inmunosupresora de RANTES y galectina-1 (Gal-1) en la respuesta alogénica utilizando el cultivo mixto linfocitario como modelo. Ambas moléculas son capaces de suprimir la respuesta alogénica en forma dependiente de la dosis induciendo apoptosis a través de mecanismos dependientes de caspasas y modulando la expresión de Bcl-2. Dado que Gal-1 y RANTES se expresan en linfocitos T activados y son capaces de modular su homeostasis, investigamos posibles interacciones entre estas moléculas. Así evidenciamos, por la técnica de Western Blot, que RANTES aumenta la expresión de Gal-1 a las 24, 48, 72 horas y 5 días de la respuesta alogénica. Además, cuando linfocitos aloreactivos se cultivaron en presencia de RANTES y de un inhibidor del factor de transcripción NFκB se logró bloquear la expresión de Gal-1 a las 0, 24, 48, 72 hs y 5 días de respuesta alogénica; sugiriendo que NFκB esta involucrado en la inducción de la expresión de Gal-1 por RANTES. En forma opuesta, Gal-1 logró aumentar la expresión de RANTES en la membrana de linfocitos T y mantener su secreción durante el CML. Cuando se realizaron alcultivos en presencia de ambas moléculas recombinantes y de sus respectivos Acs monoclonales neutralizantes, en distintas combinaciones, observamos que el Ac anti Gal-1 revierte parcialmente la supresión inducida por RANTES mientras que el Ac. anti RANTES revierte la supresión inducida por Gal-1 (p<0,05, test de Student). Estos resultados se correlacionan con los niveles de apoptosis encontrados en los mismos alcultivos y cuantificados por incorporación de Ioduro de propidio. Así concluimos que RANTES aumenta la expresión de Gal-1 y potencia su efecto supresor lográndose un poderoso bloqueo de la respuesta alogénica planteando la interacción funcional entre dichas moléculas en el control de dicha respuesta.

416. (8027) PARTICIPACIÓN DE LA IL-1 EN LA PROMOCIÓN DE LA APOPTOSIS MEDIADA POR TNF-ALFA EN GRANULOCITOS NEUTRÓFILOS HUMANOS. SALAMONE, GABRIELA; ÁLVAREZ, MARÍA EUGENIA; COSTAS, MÓNICA; TREVANI, ANALÍA; NAHMOD, KAREN; VERMEULEN, MÓNICA; FUXMAN BASS, JUAN; GEFFNER, JORGE

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina; Dto Microbiología, Facultad de Medicina, UBA.

Previamente demostramos que el TNF-alfa ejerce un efecto promotor de la apoptosis del neutrófilo, permitiendo a diversos agonistas actuar como poderosos promotores de la misma. En este trabajo evaluamos si citoquinas que han sido descritas como antiapoptóticas sobre neutrófilos en reposo, eran capaces

de modular la inducción de apoptosis en neutrófilos primados con TNF-alfa. Los neutrófilos fueron preincubados con TNF-alfa (10 ng/ml) en ausencia o presencia de IL-1, IL-6 o IL-8 (10 ng/ml) y luego expuestos durante 3 hs a diferentes agonistas: Zimozán (50ng/ml), IgG inmovilizada (IgGi) o el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, 100ng/ml). Mientras que la IL-6 y la IL-8 no modularon la progresión a la apoptosis, las IL-1alfa e IL-1beta (10ng/ml) indujeron un incremento significativo (p<0.01) en el porcentaje de células apoptóticas, para todos los agonistas ensayados. Esta acción estimuladora de la apoptosis mediada por IL-1 se asoció a una expresión disminuida de la proteína antiapoptótica Mcl-1, por ensayos de Western Blot. Observamos, por otra parte, que el bloqueo del receptor de IL-1, mediante el empleo de un antagonista específico, inhibió significativamente (p<0.01) la inducción de apoptosis en células pretratadas con TNF-alfa y luego expuestas a IgGi, sugiriendo que la producción autócrina de IL-1 en neutrófilos pretratados con TNF-alfa participa en la estimulación del fenómeno apoptótico. Los resultados obtenidos muestran que el pretratamiento de los neutrófilos con TNF-alfa subvierte el modo en el cual éstos perciben su entorno, permitiendo a una citoquina antiapoptótica como la IL-1 (definida como tal en función de la acción ejercida sobre neutrófilos en reposo) mediar un efecto promotor de la apoptosis.

417. (8080) ALTERACIÓN EN LA ACTIVACION DE NF-KB EN LINFOCITOS T INDUCIDA POR EXPOSICIÓN A ESTRES CRÓNICO. CAMINOS INTRACELULARES INVOLUCRADOS. SILBERMAN, DAFNE MAGALÍ (1); PALUMBO, MARÍA LAURA (1); ZORRILLA-ZUBILETTE, MARÍA (2); CREMASCHI, GRACIELA (1,3); GENARO, ANA MARÍA (1,3)

(1) Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET; (2) 1ra. Cat. Farmacología, FMed, UBA (3) Lab. Radioisótopos, FFyB, UBA

La proliferación de linfocitos T (LT) es mediada por una compleja serie de eventos intracelulares. La activación del factor NF-κB mediada por el reclutamiento de la isoforma theta de proteína quinasa C (PKC theta) hacia la sinapsis inmunológica es esencial en la respuesta T a la estimulación antigénica. En un trabajo previo encontramos que la respuesta proliferativa de LT inducida por mitógeno está disminuida tras exposición a estrés crónico. El objetivo del presente trabajo fue analizar la participación del NF-κB en la alteración inmunológica mencionada. A tal fin se estudió la activación del NF-κB determinando la presencia del inhibidor de este factor en extractos citosólicos por técnicas de western-blot. Asimismo se determinó la traslocación de este factor al núcleo por ensayos de movilidad electroforética (EMSA). Observamos que los linfocitos de ratones BALB/c expuestos al modelo de estrés crónico moderado (LE) presentan una menor disminución de la expresión del inhibidor del NF-κB al ser estimulados 30 minutos con concanavalina A (Con A) respecto de la hallada en linfocitos normales (LN)(p<0.05, n=4). Paralelamente una menor traslocación de este factor nuclear fue hallada en LE tras activación con Con A (p<0.05, n=4). Asimismo observamos una menor traslocación de la PKC theta luego de 20 minutos de exposición al mitógeno (% de traslocación, LN= 32± 4, LE= 12±2, n=4). Esta traslocación de PKC theta parece ser consecuencia de la menor activación de PKC alfa observada tras 10 minutos de estimulación con Con A (LN= 35±6%, LE= 19±4%, n=4). Concluimos que el estrés crónico induce una alteración en la cascada de señalización disparada por la activación de linfocitos T. La misma podría estar involucrada en el déficit inmunológico observado en individuos afectados por este tipo de estrés.

418. (8095) LOS RECEPTORES DE IFNγ COMPARTEN UNA SUCUENCIA TIR-X-X-LEU-ILE (YXXLI) INTRACELULAR COMO FACTOR ASOCIADO A ENDOCITOSIS Y RESPUESTA. ROSENZWEIG, SERGIO D; HOLLAND, STEVEN M

Serv Inmunología, Hospital Garrahan; Laboratory of Clinical Infectious Diseases, NIAID, NIH, MD, USA

El complejo receptor del IFN γ (IFN γ RC) está constituido por 2 moléculas de IFN γ R1 y 2 de IFN γ R2. Estos receptores pertenecen a la clase 2 de la familia de los receptores de citoquinas y se encuentran constitutivamente expresados en células nucleadas. Una secuencia LI en posición 270-271 del IFN γ R1 ha sido anteriormente asociada a la endocitosis de este receptor. Estudios *in vitro* con receptores truncados inmediatamente por debajo del dominio de transmembrana (hgR.delta IC) o deleciones intracitoplasmáticas proximales (hgR.delta 256-303) avalaban esta hipótesis. Recientemente, nosotros describimos una secuencia YxxLI en el IFN γ R2 como reguladora de la endocitosis, acumulación y respuesta a IFN γ en este receptor. Este motivo YxxLI 252-256 presenta homología simultánea con los motivos de endocitosis basados en tir (Yxx0) y aquellos basados en dileucinas (LL o LI). El análisis de la secuencia del IFN γ R1 en busca de dominios de endocitosis mostró la existencia de otro dominio LI 290-291, que a diferencia del LI 270-271, está antecedido por una secuencia Yxx (YxxLI 287-291). Nosotros generamos una serie de vectores de expresión mutantes GFP-IFN γ R1 para determinar su nivel acumulación, distribución y capacidad de transducción de señales en células transfectadas. La deleción de LI 290-291 pero no de LI 270-271 llevó a la sobreacumulación en la superficie celular del receptor mutante, habiendo perdido ambos receptores su capacidad de transducir señales. Nuestros resultados sugieren que la secuencia LI 290-291, y no la ubicada en posición 270-271, está asociada a la endocitosis de este receptor. Los estudios realizados con los vectores hgR.delta IC y hgR.delta 256-303, que simultáneamente deletaban los 2 motivos LI (270-271 y 290-291), no permitían distinguir el rol individual de cada uno de ellos. Nuestros estudios también sugieren que una nueva forma de motivo de endocitosis (YxxLI) regula la expresión y funcionalidad de los receptores de IFN γ .

INMUNOLOGÍA 6: INMUNIDAD CONTRA BACTERIAS

419. (6689) ADMINISTRACIÓN ORAL E INTRANASAL DE LACTOCOCCUS LACTIS EN UNA INFECCIÓN POR STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA (1,2) MEDINA, M; (2) VILLENA, J; (1, 2) ALVAREZ, S

(1) CERELA. Chacabuco 145. 4000. Tucumán, (2) Facultad de Bioqca, Qca y Fcia. U.N.T.

La vacuna disponible contra *Streptococcus pneumoniae* no es inmunogénica en grupos de riesgo, siendo necesario generar nuevas estrategias para inmunizar mucosa respiratoria. Este trabajo estudia el efecto sobre el sistema inmune de la administración oral y nasal de *Lactococcus lactis* NZ9000, para evaluar su capacidad adyuvante o su potencial empleo como vector de vacunas anti-neumococo. A ratones albino-suizos se les administró *L. lactis*: I) en el agua de bebida (10(8) céls/día/ratón) por 5d, II) la misma dosis por vía intranasal (in) durante 2,5 y 7d. Al final de cada período, estos grupos y animales controles (CI) fueron infectados por vía in con el patógeno (10(6) UFC/ratón) y durante 15d post-infección (dpi) se realizó: a) Recuento (Rto) del patógeno en pulmón y hemocultivos b) Rto. total y diferencial de leucocitos en sangre y lavado broncoalveolar (BAL), c) Cél. NBT+ en BAL y cavidad peritoneal d) Determinación de IgG e IgA anti-neumococo en suero y BAL por ELISA. *L. lactis* 5d por vía in (LL5din) y oral (LL5d) redujeron el Rto del patógeno en pulmón (CI15dpi=5,6±0,2UFC/g, LL5d15dpi=3,0±0,1, LL5din15dp=2,0±0,1). Sólo LL5din y LL7din evitaron la diseminación, con hemocultivos negativos en todo el período ensayado. La infección incrementó los leucocitos en sangre y BAL en todos los grupos, sin diferencias entre ellos. La administración in y oral aumentó las cél. NBT+ antes y después del desafío (%cél. NBT+ BAL: CI1dpi=63, 8±1,1; LL5d1dpi=78,4±1,2; LL5din1dpi=79,2±1,1). LL5din y LL5d incrementaron la IgA en BAL (CI15dpi=1,337±0,024DO/200ul, LL5d15dpi=1,735±0,039, LL5din15dpi=2,435±0,039) mientras que sólo la vía in incrementó la IgG en suero y BAL (Suero CI15dpi=1,733±0,038, LL5din15dpi=2,755±0,054). *L. lactis* NZ

9000 mejoró la respuesta inmune innata y específica frente a la infección por *S. pneumoniae*, pero sólo la vía in evitó la diseminación del patógeno. Su capacidad transformante y sus propiedades adyuvantes harían de esta cepa un buen candidato a ser usado como vector de vacunas.

420. (6944) APLICACIÓN DIAGNÓSTICA: ANTIGENOS EXTRACELULARES ASOCIADOS AL SISTEMA DE SECRECIÓN VIRB DE BRUCELLA ABORTUS. DELPINO, MARIA VICTORIA; FOSSATI, CARLOS ALBERTO; BALDI, PABLO CÉSAR

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral.

En el diagnóstico de la brucelosis humana y animal se han usado antígenos citoplasmáticos y de membrana, pero no se han evaluado antígenos secretados, los que han demostrado valor diagnóstico en otras infecciones (*M. tuberculosis*, *H. pylori*). Esto se debe a que no se han descrito proteínas secretadas por *Brucella*, aunque la bacteria posee un sistema de secreción tipo IV, codificado por el operón virB e involucrado en la supervivencia intracelular del patógeno. Hemos identificado en el sobrenadante de cultivo de *Brucella abortus* 2308 (wild type) 10 proteínas que están ausentes en una mutante isogénica para el aparato de secreción VirB. Dos de estas proteínas, Coloilo Glicina Hidrolasa (CGH) y Peptidil Prolil cis trans Isomerasa (homóloga a SurA de *E. coli*), se obtuvieron en forma recombinante y se analizó su utilidad diagnóstica por ELISA indirecto, usando sueros de caninos y humanos con brucelosis. Se usaron sueros de individuos no infectados para calcular el valor de Cut off (densidad óptica -DO- media 2SD). La distribución de DO contra SurA fue similar en personas infectadas y normales, y lo mismo ocurrió con CGH. Ninguno de los sueros de pacientes brucelosos (N=62) fue positivo contra SurA, debido al elevado Cut off (1,038) y a la baja reactividad media de los infectados (0,560). Un resultado similar se obtuvo cuando se analizó la reactividad anti-CGH (cut-off= 1,148; reactividad media de los infectados= 0,372), siendo positivos sólo 2 de los sueros analizados. En caninos, aunque el cut-off para CGH fue menor que en humanos (0,591), sólo dieron resultado positivo 47 de 144 sueros (32,6%). En cuanto a SurA, el cut-off fue 0,925 y fueron positivos 34 de 144 sueros (23,6%). Los resultados indican que los ELISAs basados en CGH y SurA tienen baja sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la brucelosis humana y canina. La alta reactividad de los sueros normales contra estas proteínas podría deberse a la presencia de homólogos en otras bacterias comunes en el hombre y el perro.

421. (7325) PREVENCIÓN DE LOS EFECTOS DE LA TOXINA SHIGA-2 DURANTE EL CRECIMIENTO RENAL COMPENSATORIO. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS. CAMERANO, GABRIELA; BUSTUO-ABAD, OSCAR; MEISS, ROBERTO (1); CYMBERKNOP, DORA (2); PALERMO, MARINA (3); DRAN, GRACIELA

División Medicina Experimental, ILEX CONICET, (1) Patología IEO, (2) Med. Nuclear IEO, (3) Inmunología IIHEMA, Academia Nacional de Medicina

La nefrectomía unilateral (Unx) induce hipertrofia, hiperplasia y aumento de la funcionalidad del riñón remanente, proceso denominado crecimiento renal compensatorio (CRC). Existen evidencias acerca de que durante el CRC el tejido renal sería menos susceptible a una variedad de patologías. Utilizando un modelo murino de síndrome urémico hemolítico (SUH) inducido por la inyección de la toxina Shiga-2 (Stx2) se determinó previamente que los animales Unx son altamente refractarios al daño renal y a la mortalidad inducidos por Stx2. En esta etapa se investigó cuales de los fenómenos que tienen lugar durante el CRC otorgarían dicha protección y los mecanismos involucrados. Se estudió el flujo sanguíneo renal mediante cámara gamma; se determinó que la Stx2 induce una progresiva isquemia, tanto cortical como medular. La Unx realizada 48 horas antes de la administración de la Stx2 previno dicha isquemia y restauró el

flujo a un 80% de su valor normal (normal: 11181±666; Stx2: 3334,5±860*; Unx+Stx2: 8589±946# cuentas por área. *: $p < 0,001$ vs control normal; #: $p < 0,001$ vs Stx2; $n = 12$). El efecto de la Unx se produjo fundamentalmente a expensas del flujo cortical. Se estudió también la expresión renal de las óxido nítrico sintasas (NOS) endotelial e inducible mediante inmunohistoquímica. Se observó una expresión basal de eNOS en el riñón normal, la que disminuye por la administración de Stx2. La Unx genera por sí misma un aumento gradual en la expresión de eNOS, y contrarresta la inhibición de esta enzima por Stx2. La administración de Stx2 por otro lado induce la expresión de iNOS en ratones normales, pero no en aquellos Unx. En conjunto, estos resultados sugieren que la Unx previene la toxicidad de la Stx2 al menos a dos niveles: disminuye la isquemia renal inducida por Stx2 restaurando el flujo cortical, y contrarresta los efectos de la toxina sobre la modulación de la expresión renal de las NOS endotelial e inducible.

422. (7341) ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE ENTEROCOCCUS FAECALIS MR1024 EN RATONES BALB/C DESAFIADOS CON SALMONELLA SEROTIPO ENTERITIDIS. CASTRO, MARISA; ANDINO, JOSÉ (1); GENTILINI, ANTONELA (1); CECI, MÓNICA (2); LAVIGNE, VICTORIA (1); SPARO, MÓNICA (2); MANGHI, MARCELA (1)

(1) IDEHU, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; (2) Centro de Estudios Bioquímicos, Tandil, Buenos Aires

En estudios previos hemos demostrado que *Enterococcus faecalis* MR1024 no expresa fenotípicamente factores de virulencia, resiste el pH gástrico, produce una bacteriocina con amplio espectro, se adhiere y persiste en el tejido intestinal de ratones. En este trabajo se estudió su capacidad protectora en ratones BALB/c desafiados con *Salmonella* serotipo Enteritidis. Dos grupos de 20 ratones de 6 semanas recibieron durante 6 días por vía i.g. 200 µl de SF (control) o de *E. faecalis* MR1024 (3.10(8) cel/ml). Al día 7, 8 y 9 ambos grupos fueron desafiados i.g. con dosis de 200 µl de *S. serotipo Enteritidis* (5.10(4) cel/ml) (control) o de su mezcla con *E. faecalis* MR1024 (3.10(8) cel/ml). Se efectuó el estudio microbiológico intestinal ($n = 10$) y el recuento de sobrevida ($n = 10$) en cada grupo. Los animales fueron observados durante 15 días. En los intestinos de los ratones del grupo control se contaron 8,37 log UFC/g de *S. serotipo Enteritidis* y se observó un importante desplazamiento de las bacterias autóctonas coliformes sin detectarse la presencia de *E. coli*. En los que recibieron *E. faecalis* MR1024 antes del desafío, no se detectó la presencia de la cepa patógena (recuento en agar *Salmonella*-*Shigella*) pero sí de enterococos (4,21 log UFC/g) y coliformes (7,25 log UFC/g). Estas observaciones son concordantes con la muerte de todos los ratones del grupo control y la supervivencia del total de los animales que recibieron *E. faecalis* MR1024. Los resultados demuestran la capacidad probiótica de *E. faecalis* MR1024 pues resultó inocua y protegió al 100% de los animales del desafío con *S. serotipo Enteritidis* y alientan el empleo de esta bacteria en otros modelos de infecciones bacterianas y parasitarias.

423. (7408) ARTRITIS REACTIVA INDUCIDA POR YERSINIA ENTEROCOLITICA O:3: ESTUDIO DE EVENTOS INMUNOLOGICOS EN MUCOSA DE RATONES KNOCKOUT EN IL-12. CARGNELUTTI, DIEGO ESTEBAN; CASTRO, DIEGO; GUTIERREZ, YESICA; ELIÇABE, JAVIER; STEFANINI, ANA; DI GENARO, SILVIA

Area Microbiología, Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis

La artritis reactiva (ARe) es una sinovitis aséptica, secuela de infecciones en mucosa gastrointestinal o genitourinaria. *Yersinia enterocolitica* O:3 está asociada a ARe en humanos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la importancia de IL-12 en ARe inducida por *Y. enterocolitica* O:3. Ratones C57BL/6

normales y knockout en IL-12 (IL-12p40^{-/-}) fueron infectados por vía intragástrica con *Y. enterocolitica* O:3 (7 x 10(8) UFC). Tres y 22 días postinfección (p.i.) se realizaron recuentos bacterianos en placas de Peyer (PP), ganglio mesentérico (GM), bazo (B) y articulación (A). Se evaluó la respuesta proliferativa de esplenocitos estimulados con lipopolisacárido O:3 (LPS O:3), *Yersinia* muerta por calor (HKY) y concanavalina A (Con A). La expresión del RNAm de IFN-gamma, TNF-alfa, IL-10, Bcl-2, Bax, y de los receptores Toll-like 2 y 4 (TLR-2 y TLR-4) fue estudiada en GM por RT-PCR. Apoptosis fue investigada en B, PP y GM. Respuestas de IgM, IgG, IgA, IgG1 e IgG2a anti-LPS O:3, colágeno I y sonicado de *Yersinia* fueron estudiadas los días 1, 7, 14 y 22 p.i. El día 3 p.i. los recuentos bacterianos en B, PP y GM fueron mayores en ratones IL-12p40^{-/-} ($p < 0,004$, $p < 0,02$ y $p < 0,01$, respectivamente). En ratones knockout la bacteria persistió en PP hasta día 22 p.i. Menor respuesta proliferativa fue observada frente a LPS O:3 ($p < 0,01$), HKY ($p < 0,03$) y Con A ($p < 0,0006$). Ratones IL-12p40^{-/-} presentaron mayor fragmentación de DNA en PP e intensa expresión en GM del RNAm de TNF-alfa y TLR-2. No se observó expresión de IFN-gamma. El día 7 p.i. se detectó mayor respuesta de IgG1 anti-LPS O:3 en ratones IL-12p40^{-/-} ($p < 0,005$). Se concluye que IL-12 controla eventos inmunológicos tempranos a nivel de mucosas que contribuyen a la eliminación de *Y. enterocolitica* O:3. Deficiencia de IL-12 podría estar implicada en la persistencia de la bacteria en mucosas y en el desarrollo de ARe inducida por *Yersinia*.

424. (7560) EFECTOS DEL USO IN VITRO DE ALFA-IFNRHU SOBRE UNA LÍNEA DE MACRÓFAGOS BOVINOS INFECTADOS CON DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS. FONTANALS, ADRIANA M. (1); GENTILINI, ELIDA (1); MUNDO, SILVIA L. (1)

(1) Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA.

La fagocitosis efectuada por macrófagos residentes en los tejidos, es uno de los mecanismos más importantes de la inmunidad innata. Su modulación puede ser una herramienta terapéutica. Existe en el mercado interferón alfa recombinante humano (αIFN_{rh}). Para conocer la posibilidad de su uso en bovinos productores de leche, se evaluó sobre una línea celular de macrófagos de dicha especie (BoMac) infectados con bacterias aisladas de mastitis. Se estableció una dosis de 40000UI/ml. Se colocaron un millón de macrófagos por ml, en placas de Petri con cubreobjetos para facilitar la adherencia. Luego de dos estímulos con un intervalo de 24 hs, se infectaron las células tratadas con αIFN_{rh} y los controles con 5 cepas bacterianas teñidas con isotiocianato de fluoresceína. A los 30 minutos se detuvo la reacción y se teñieron los macrófagos con Giemsa. Indicando sin αIFN_{rh} y tratados con αIFN_{rh} respectivamente, los resultados de 3 experimentos independientes, expresados en porcentaje de ingestión fueron: *Staphylococcus epidermidis* 33% y 52%, *Staphylococcus aureus* 28% y 58%, *Streptococcus agalactiae* 26.3% y 48%, *Escherichia coli* 22.60% y 35.6%, *Klebsiella* spp. 25.20% y 21.88%. Se analizaron con t de Student dando diferencias significativas $p < 0.05$, excepto con *Klebsiella* spp. En todos los casos, los cultivos estimulados con IFN presentaron mayor número de células adherentes y con tamaño superior a las células del control, además mejoraron la ingestión. En *Klebsiella* spp. sólo se observaron diferencias en la morfología celular. Dentro de la glándula mamaria, el macrófago es fundamental para la interacción de la inmunidad innata y adaptativa. Las cepas evaluadas fueron aislamientos obtenidos de mastitis bovinas, el tratamiento in vitro con IFN_{rh} mejoró la ingestión de bacterias por los macrófagos. Entonces, durante el período de involución mamaria, el IFN_{rh} podría usarse para mejorar la eficiencia de los macrófagos residentes.

425. (7618) CÉLULAS EPITELIALES PROSTÁTICAS ACTÚAN COMO SENSORES TEMPRANOS DE UNA INFECCIÓN EXPRESANDO TLR4, TLR2 Y AUMENTANDO LA EXPRESIÓN DE QUIMEOQUINAS. GATTI, GERARDO; RIVERO, VIRGINIA; MACCIONI, MARIANA

Depto. Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. CIBICI-CONICET

Numerosas evidencias sugieren un importante rol de las células epiteliales (CE) en la respuesta inmune innata. El objetivo de este trabajo fue investigar si las CE pueden manifestar tempranamente una infección e iniciar un proceso inflamatorio en un sitio anatómico como la próstata, normalmente estéril. Dado que *E. coli* es una de las causas más frecuentes de infección de la glándula prostática por bacterias que ascienden por reflujo urinario, quisimos saber si las CE prostáticas tienen un fenotipo respondedor al LPS de esta bacteria. Para ello, la línea epitelial de próstata de rata JHU-4 fue estimulada con 100 µg de LPS de *E. coli* por 6, 24 y 48 horas. Los niveles de expresión de los ARNm de las quimoquinas CCL5 (RANTES), CCL3 (MP1a), CXCL10 (IP10), CCL2 (MCP-1), CXCL8 (IL8), y CCL4 (MIP1b) fueron evaluadas por RT-PCR y relativizados a los niveles de B-actina. La estimulación de esta línea celular con LPS indujo la expresión de los ARNm de CCL5, CCL3 y produjo un marcado aumento en los niveles de expresión de CXCL10 (más de 3 veces respecto al basal) y CCL2 (más de 2 veces respecto al basal), cambios que ya pueden ser detectados a las 6 horas post-estimulo. Aunque las células JHU-4 expresan niveles basales de CXCL8, los mismos se incrementaron al menos 2 veces a las 24hs p.e., mientras que los niveles de CCL4 no mostraron diferencias significativas. Por otro lado, pudimos observar una expresión constitutiva de TLR4 que aumenta a las 24h p.e, mientras que la expresión de TLR2 se induce tan temprano como a las 6h p.e. También pudimos demostrar la expresión constitutiva de CD14, componente esencial para la señalización vía estos TLRs. Estos resultados demuestran que CE prostáticas expresan TLR4 y CD14 en forma constitutiva, induciendo la expresión de TLR2 tempranamente post estimulación, sugiriendo que las CE actúan como sensores en una infección temprana expresando un amplio espectro de quimoquinas que podrían facilitar la iniciación de una respuesta inflamatoria.

426. (7641) IMPORTANCIA DE LOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS HUMANOS EN EL DAÑO DE CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCIDO POR TOXINA SHIGA DE TIPO 1 Y AGENTES PROINFLAMATORIOS. LANDONI, VERÓNICA ; NEGROTTI, SOLEDAD ; D' ATRI, PAOLA; RAMOS, VICTORIA; FERNÁNDEZ, GABRIELA; PALERMO, MARINA ; SCHATTNER, MIRTA ; ISTURIZ, MARTÍN

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

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal aguda. Típicamente, se desarrolla en niños como una enfermedad vascular luego de diarreas sanguinolentas. El SUH es causado habitualmente por bacterias Gram negativas con serotipos de *Escherichia coli* productores de toxinas Shiga (Stx). Se ha sugerido que la presencia de Stx es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de SUH, hecho que requeriría, además, de estímulos proinflamatorios. Por otra parte, la neutrofilia está asociada a un mal pronóstico del SUH, aunque se desconoce si la misma constituye un epifenómeno o es un elemento necesario para el desarrollo de la fisiopatología del daño renal. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar la importancia de los neutrófilos (PMN) en el daño endotelial inducido por Stx-1 y agentes proinflamatorios como LPS y TNF-alfa. Con esa finalidad se utilizaron células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC) y neutrófilos purificados de sangre periférica de donadores normales. En principio las HUVEC fueron incubadas durante 24 horas con LPS 1µg/ml y Stx-1 5 ng/ml. Luego se retira el estímulo y se agregan los neutrófilos. Los efectos citotóxicos sobre las células endoteliales se evaluaron a las 24 horas por recuento de células por campo. Los resultados, expresados en porcentaje de daño con respecto a los controles ± SD, fueron los siguientes: LPS + Stx: 43±3, Stx + PMN: 45±6, LPS + Stx + PMN: 95±4. Efectos similares fueron obtenidos utilizando TNF-

alfa en lugar de LPS. Los resultados indican que los mediadores inflamatorios (TNF-alfa, LPS) son necesarios, pero no suficientes para inducir una citotoxicidad máxima dependiente de Stx-1. Para que ello se manifieste se requiere la presencia de PMN, hecho que podría explicar la correlación entre el mal pronóstico de la enfermedad y neutrofilia.

427. (7721) INVESTIGACION POR METODOS INMUNOLOGICOS Y MOLECULARES DE YERSINIA ENTEROCOLITICA EN LIQUIDOS SINOVIALES DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA. LACOSTE, MARIA GABRIELA (1); TAMASHIRO, HECTOR (2); STEFANINI, ANA (1); DI GENARO, SILVIA (1)

(1) Area Microbiología, Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis (2) Complejo Sanitario San Luis. Caídos en Malvinas 110.

Yersinia enterocolitica puede causar artritis reactiva (ARe). El estudio de la patogénesis de ARe podría ser usado como modelo para el estudio de artritis reumatoidea (AR) de etiología desconocida. El objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia de DNA de *Y. enterocolitica* en líquidos sinoviales (LS) de pacientes con AR y correlacionar estos resultados con ensayos inmunológicos. Se obtuvieron 49 LS de pacientes con artropatías: 5 con espondiloartropatías (SpA), 20 con AR y 24 con artrosis. Se estudió por ELISA las respuestas de inmunoglobulinas totales (IgM, IgG e IgA) y de IgA específica para lipopolisacárido (LPS), sonicado (Soni) y proteínas de sobrenadante (SN) de *Y. enterocolitica*. El punto de corte fue calculado con los LS de pacientes con artrosis. Los LS positivos fueron ensayados por inmunoblotting y por PCR empleando primers específicos para el gen *Lcr E* de *Yersinia*. Anticuerpos específicos y DNA de una bacteria de alta prevalencia como *Salmonella* fueron investigados en los LS. Once LS de pacientes con AR mostraron respuesta frente a ambas bacterias. Por inmunoblotting se observaron bandas compartidas. Cuatro de estos LS mostraron respuesta de IgA sólo para *Yersinia*, los cuales fueron también positivos por PCR. Se concluye que DNA de *Yersinia* y respuesta de anticuerpos específicos para *Yersinia* pueden estar presentes en LS de pacientes con AR. La detección de DNA bacteriano en combinación con respuesta de IgA específica podrían ser empleados para discriminar la bacteria artrítogénica implicada en el proceso inflamatorio articular. La etiología de la AR podría relacionarse, por razones genéticas, con cambios a nivel intestinal que favorecen el pasaje de productos de bacterias artrítogénicas, los cuales podrían causar respuesta inflamatoria, exposición de antígenos articulares y autoinmunidad.

428. (7830) LA LIPOPROTEÍNA DE B. ABORTUS OMP19, UN NUEVO CANDIDATO PARA VACUNAS ACELULARES CONTRA LA BRUCELOSIS. PASQUEVICH, KARINA; CASSATARO, JULIANA; ESTEIN, SILVIA; ZWERDLING, ASTRID; FOSSATI, CARLOS; GIAMBARTOLOMEI, GUILLERMO

IDEHU, UBA. Lab. Inmunogenética, Htal. Clínicas, UBA; Lab. Inmunquímica, Fac. Cs. Vet. UNICEN. Cátedra de Inmunología, Fac. Cs. Exáctas, UNLP.

La vacunación contra la brucelosis se realiza con vacunas vivas atenuadas. La inmunización con cepas atenuadas no confiere protección total y no es segura, por lo que sería preferible el empleo de vacunas acelulares, que no presentan estos inconvenientes. Omp19 es una lipoproteína de 19 kDa que se encuentra expuesta en la superficie de la membrana externa de todas las especies del género *Brucella*. Se decidió estudiar la inmunogenicidad y la capacidad protectora de Omp19 y evaluar el rol de su porción lipídica en la inducción de esta respuesta. Omp19 fue clonada y purificada en su forma lipídica (L-Omp19) y no lipídica (S-Omp19). Se inmunizaron ratones Balb/c con L-Omp19, S-Omp19, *B. abortus* cepa S19 (vacuna control) o solución fisiológica (SF) emulsionados en adyuvante de Freund in-

completo. Tanto L-Omp19 como S-Omp19 indujeron protección significativa frente a la infección con *B. abortus* (1,28 y 1,64 log de protección, respectivamente, $p < 0.001$). La cepa S19 indujo 1,93 log de protección. A partir de los resultados obtenidos se decidió caracterizar la respuesta generada por la inmunización. Los títulos de anticuerpos IgG específicos determinados por ELISA, alcanzaron el día del desafío valores promedio de 2800 (L-Omp19) y 1500 (S-Omp19). Los títulos IgG1 e IgG2a específicos inducidos por la inmunización fueron similares. La producción de IFN- γ intracelular en los esplenocitos de los animales inmunizados se evaluó mediante citometría de flujo. En los animales inmunizados el 3.34% de los linfocitos CD4 y el 12.35% de los linfocitos CD8 produjeron IFN- γ específico, mientras que en los inoculados con SF no se detectó producción antígeno-específica de esta citoquina. Nuestros resultados indican que Omp19 es un antígeno protector contra la brucelosis y sugieren que su porción lipídica no está involucrada en la respuesta protectora. Por todo esto proponemos que Omp19 sería un buen candidato para el desarrollo de una vacuna acelular contra la brucelosis.

429. (7860) LA INSERCIÓN DE UN PÉPTIDO DE OMP31 AL EXTREMO N-TERMINAL DE LA LUMAZINA SINTETASA DE BRUCELLA SPP MEJORA SU CAPACIDAD PROTECTORA. CASSATARO, J; PASQUEVICH, K; ESTEIN, S; DE LA BARRERA, S; GOLDBAUM, F; FOSSATI, C; GIAMBARTOLOMEI, G

IDEHU, Lab. Inmunogenética. Htal. Clínicas. UBA; Lab. Inmunológica, Fac. Cs. Vet, UNICEN, IIHEMA, Acad. Nac. Med, Inst. Leloir

Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que la lumazina sintetasa (BLS) y la proteína de membrana externa Omp31 de *Brucella* son antígenos protectores contra la brucelosis. En el presente estudio se construyó una vacuna a ADN que codifica para una proteína química de BLS donde el extremo N-terminal fue reemplazado por un péptido de 27aa de Omp31 (pCIBLSOmp31). En el modelo murino de infección, pCIBLSOmp31 indujo mayor protección contra el desafío con *B. ovis* y *B. melitensis* que la co-inoculación de los plásmidos individuales (3,14 vs. 2,20 y 1,77 vs. 1,09 log de protección, respectivamente, $p < 0,001$). La co-inoculación de BLS y Omp31 como vacunas a ADN no confirió mayor protección que la inmunización de los plásmidos individuales. Los esplenocitos de los animales inmunizados con pCIBLSOmp31 fueron capaces de lisar específicamente a células blanco A20J que presentaban péptidos de Omp31 en el contexto de MHC I y MHC II. Si estos esplenocitos estaban depletados de células T CD8 la citotoxicidad disminuía un 70%, pero si estaban depletados de células T CD4 un 37%. Además de conferir citotoxicidad anti-Omp31 y anti-BLS, los linfocitos de animales inmunizados con pCIBLSOmp31 fueron capaces de lisar específicamente a una línea de macrófagos infectada con *B. ovis*. Nuevamente las células T CD8 principalmente y en menor medida las T CD4 generadas mediaban la citotoxicidad observada. Estos resultados demuestran que el péptido insertado de Omp31 le confiere actividad citotóxica anti-Omp31 a la quimera y que esta actividad citotóxica es mediada principalmente por células T CD8 pero también por células T CD4. Los resultados también demuestran que el agregado del epítopo inmunodominante de Omp31 al extremo N-terminal de la BLS mejora significativamente su capacidad protectora. Todo esto la convierte en un inmunógeno potencialmente útil para el desarrollo de una vacuna acelular contra *B. ovis* y *B. melitensis*.

430. (7867) ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE POLIMORFONUCLEARES DE PACIENTES DIABÉTICOS Y NORMALES DESAFIADOS CON PSEUDOMONAS AERUGINOSA. RACHID, M (1); GOBBATO, N (1); PERAL, MC (2); LEDESMA, M (3); PERDIGON, G (1); VALDEZ, J (1)

(1) Cátedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT; (2) Cat. de Inmunología. Fac. Bioq. U.N.T.; Dept. Biomédico, Fac. Medicina. U.N.T. 3- Lab. de Análisis.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista cuya patogenicidad es controlada por un sistema de señales quórum sensing, que químicamente son acil homoserin lactonas (AHLs). El principal sistema de defensa del hospedador para este patógeno son los fagocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN). Se demostró que las AHLs pueden ser inactivadas por células humanas del epitelio respiratorio, controlando así la patogenicidad del microorganismo. Objetivos: Estudiamos in vitro la inactivación de AHLs en forma comparativa: PMN provenientes de pacientes (mujeres entre 40-60 años) diabéticas y normales y lo relacionamos con la apoptosis inducida por las AHLs y con la capacidad fagocítica de los PMNs desafiados con *P. aeruginosa*. Materiales y métodos: Se estudiaron pacientes diabéticos ambulatorios, sin complicaciones clínicas, con más de 2g/l de glucemia al momento de la extracción y normales. Los PMN se purificaron a partir de sangre circulante por Ficoll-Hipaque y dextrano al 6%. Inactivación de AHLs: se midió en sobrenadante de cultivo de PMN de 10(6) cél. adicionado con 100 ul de sobrenadante de cultivo de *P. aeruginosa*, incubadas 4 hs a 37°C. La medición se realizó utilizando cepas genéticamente modificadas sensibles a AHLs (qsc129b) productoras de β -galactosidasa mediante técnica de Miller. Los resultados se expresaron en porcentaje respecto a un control 100% (medio RPMI más 100 ul de sobrenadante de *P. aeruginosa*). Para la fagocitosis, 10(6) PMN fueron desafiados con $5 \times 10(7)$ microorganismos y se la determinó por Inmunofluorescencia ind. La apoptosis fue ensayada por Tunnel. Resultados: AHLs en sobrenadantes de PMN: diabéticos: $61\% \pm 6$, PMN normales: 52 ± 4 ; Apoptosis: diabéticos: 33 ± 10 , normales: 20 ± 8 ; Fagocitosis: diabéticos: 38 ± 15 , Normales: 128 ± 18 . Los PMN de diabéticos tienen menor capacidad para inactivar las AHLs, menor capacidad fagocítica y son más sensibles a la apoptosis inducida por *P. aeruginosa*. Esto condicionaría su mayor susceptibilidad a las infecciones.

431. (7932) LA LUMAZINA SINTETASA DE BRUCELLA ABORTUS ACTIVA CÉLULAS DENDRÍTICAS A TRAVÉS DE TLR-4. BERGUER, PAULA (1); MUNDIÑANO, JULIANA (2); PIAZZON, ISABEL (2); GOLDBAUM, FERNANDO (1)

(1) Lab Inmunología Estructural y Molecular, Fund Inst Leloir; (2) ILEX-CONICET, Div Med Exp, IIHEMA, Acad Nac de Medicina

La Lumazina Sintetasa de *Brucella abortus* (BLS) es una proteína altamente inmunogénica. Genera una fuerte respuesta humoral in vivo aun en ausencia de adyuvantes. Para estudiar las causas de su inmunogenicidad, se analizó el efecto de la interacción entre BLS y células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs). Se cultivaron BMDCs de ratones BALB/c con a) BLS 5 μ M o b) PBS y 18hs después se analizó por citofluorimetría la expresión de moléculas coestimulatorias. Se descartó que los efectos observados se debieran a contaminación con LPS, ya que se preincubó con polimixina B (PMB) soluble o PMB-agarosa. En las células incubadas con BLS, dentro de la subpoblación CD11c+ (75-85%) se observaron aumentos significativos en los porcentajes y fluorescencia media de células que expresan CD40, CD80, I-Ad y CD86. Los resultados se expresan como la media del porcentaje \pm SD (n=3). Ejs: %CD86hi/CD11c+: (a) 13.8 ± 0.3 ; b) 2.9 ± 0.4 , $p < 0.0001$; %CD80hi/CD11c+: (a) 36.9 ± 0.5 ; b) 19.3 ± 1.8 , $p < 0.0001$. Al preincubar BLS con anticuerpos anti-BLS, los valores resultaron similares al control. Los receptores de tipo Toll (TLRs) están implicados en el reconocimiento de moléculas de origen microbiano por el sistema inmune innato y se expresan en BMDCs. En las BMDCs de ratones TLR2-/- se observaron aumentos significativos en los marcadores analizados, mientras que en ratones TLR4-/- y C.3H tlr4 lps-d no aumentó ninguno de ellos. Se comparó la producción de citoquinas por ELISA de sn de BMDCs de ratones BALB/c incubadas 18hs con a) BLS y b) PBS usando PMB o PMB-agarosa. BLS indujo la producción de las citoquinas IL-6, IL-12p70 y TNFalfa. Los datos se expresan como la media \pm SD (n=3) en pg/ml: Ej: TNFalfa a) 338.4 ± 43.8 ; b) 23.0 ± 12.8 ; $p < 0.0002$. Estos resultados muestran que BLS activa a las células dendríticas y que el TLR4 está involucrado en este proceso.

INMUNOLOGÍA 7: INMUNO-ONCOLOGÍA

432. (6869) AVANCES EN LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES TISULARES EN EL CÁNCER COLORRECTAL. CROCE, MARIA; LACUNZA, EZEQUIEL; COLUSSI, ANDREA; SEGAL-EIRAS, AMADA

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

Numerosos factores se han relacionado con la aparición y diseminación del cáncer colorrectal incluyendo marcadores tumorales tales como diversas glicoproteínas y glicolípidos. Objetivo: estudiar la expresión de glicoproteínas y epitopes carbohidratos en pacientes con carcinoma colorrectal. Materiales: 75 muestras de carcinoma colorrectal, 15 de neoplasias benignas y 16 de mucosa colorrectal normal. Métodos: inmunohistoquímica, separación de fracciones subcelulares y análisis mediante SDS-PAGE e inmunoblotting empleando los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-MUC1, reactivos con el centro proteico (C595) y (HMFG1) y con la cola citoplasmática (CT2); anti-MUC2 (PMH1) y anti- α 1-glicoproteína ácida (AGP) y el glicolípido colónico normal (GCN, C505); reactivos con antígenos carbohidratos: Le x (KM380), sLe x (KM93), Le y (C14) y sLe a (KM131). Resultados: en las muestras normales por IHQ se observó reacción positiva en el 100% (16/16) de GCN, 94% (15/16) de MUC2, 81,2% (13/16) de sLe a y un 6,2% (1/16) para Le y; sLe x no mostró expresión. Las muestras benignas expresaron 100% (16/16) de GCN, 86% (13/15) de MUC2, 94% (14/15) de sLa, (8/15) 53% de sLex y 13% (2/15) de Le y. En las muestras malignas se observó un incremento de la expresión de Le y (32/75, 43%) y AGP (54/75, 72%) y una disminución de GCN 80% (60/75) y Le x en 43/75 (57,3%). Se observó una alta expresión de MUC1 siendo mayor con CT2 que con C595: 87.5% versus (vs.) 62.5% en normales; 93% vs. 60% en benignas y 64% vs. 52% en malignas. Por inmunoblotting en las muestras de cáncer colorrectal, se detectaron bandas del mismo peso molecular (200 kDa) con HMFG1, PMH1, KM93 y KM13 y con anti-AGP una banda de reacción de 45 kDa. Conclusiones: 1. El aumento en la expresión de Le y y AGP y la disminución de Le x en las muestras de carcinoma colorrectal estarían relacionados con la aparición de cáncer. 2. MUC1 y MUC2 podrían ser carriers de sLe x y sLe a.

433. (6870) ANTÍGENOS CARBOHIDRATOS ASOCIADOS A LA DISEMINACIÓN Y METÁSTASIS EN EL CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO. CROCE, MARIA; RABASSA, MARTÍN; PEREYRA, ADRIÁN; SEGAL-EIRAS, AMADA

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

El carcinoma de cabeza y cuello expresa MUC1 y antígenos carbohidratos que podrían tener importancia para determinar el pronóstico de la enfermedad. Objetivo: Comparar la antigenicidad de tumores primarios con o sin diseminación metastásica y de los ganglios comprometidos en el carcinoma de cabeza y cuello. Materiales y Métodos: Se empleó inmunohistoquímica estándar utilizando los anticuerpos monoclonales C595 (MUC1), KM380 (Lex), KM93 (sLex), C14 (Ley), anti-Tn (hapteno Tn) y anti-sialil-Tn (hapteno sTn) en muestras histológicas de 121 pacientes con enfermedad neoplásica localizada en laringe y en cavidad oral, 64 (53%) sin enfermedad diseminada (N=0) y 57 (47%) con metástasis ganglionares (N³¹). Se obtuvieron ganglios con metástasis en 18 pacientes. Se empleó el test de X2 para estudiar las diferencias entre grupos. Resultados: La expresión de C595 en los tumores no diseminados fue de 21/64 (33%), en tumores con diseminación 22/57 (39%) y en las metástasis ganglionares 8/18 (45%). KM93 12/64 (19%), 16/57 (28%) y 3/18 (16%), respectivamente. KM380 24/64 (38%), 26/57 (47%) y 9/18 (50%). C14 28/64 (44%), 21/57 (37%) y 5/18 (28%). Tn 0/64(0%), 3/57(5%) y 1/18(6%). Finalmente, sTn 2/64(3%), 6/57(11%) y 0/18(0%). Los tumores de laringe mostraron un aumento significativo de la expresión de Le x pasando de 9/26

(35%) en los no diseminados a 10/22 (46%) en los diseminados y 6/7 (86%) en las metástasis (p<0,04). Por otra parte, los tumores de cavidad oral mostraron una disminución significativa de la expresión de Le y, 12/21 (57%) en los no diseminados a 10/28 (36%) en los diseminados y 2/9 (22%) en las metástasis (p<0,05). Conclusión: En el carcinoma de cabeza y cuello, la diseminación tumoral se acompaña de cambios en la expresión antigénica de los epitopes carbohidratos asociados a mucinas: Le x en cáncer de laringe y Le y en cavidad oral.

434. (6872) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MUC1 EN NEOPLASIAS MALIGNAS Y BENIGNAS MAMARIAS Y MAMA NORMAL; UTILIDAD DE UN NUEVO ANTICUERPO DIRIGIDO HACIA LA COLA CITOPLÁSMICA: CT33. CROCE, MARIA; ISLA-LARRAIN, MARINA; REMES LENICOV, FEDERICO; KIM, CHUL; GENDLER, SANDRA; SEGAL-EIRAS, AMADA

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

La MUC1 es una glicoproteína de transmembrana característica del cáncer de mama compuesta por una subunidad extracitoplasmática, una de transmembrana y una intracitoplasmática (CT). Objetivos: 1- diferenciar la expresión de MUC1 en neoplasias malignas, benignas y mama normal, 2- determinar la utilidad del CT33. Materiales y métodos: Se estudiaron 106 muestras de cáncer de mama, 6 neoplasias benignas y 7 normales mediante inmunohistoquímica (IHQ). Se clasificó el patrón de expresión en: lineal (L), citoplásmico (C) y mixto (M); apical y no apical. Asimismo, se obtuvieron fracciones subcelulares que se analizaron por SDS-PAGE y Western Blot. Se empleó un análisis estadístico no paramétrico. Se emplearon anticuerpos monoclonales reactivos con MUC1: anti-CT: policlonal (CT33) y monoclonal (CT2); anti centro proteico: C595, HMFG2 y SM3. Resultados: por IHQ en cáncer de mama, el 74% (86/116) fueron reactivos con C595, el 71% (82/116) con HMFG2, el 51% (59/116) con SM3, 99/106 (93,4%) con CT33 y con CT2, 98/106 (92,4%) dieron positivas; entre los dos últimos anticuerpos se halló una correlación estadísticamente significativa (t=0,35548). La principal diferencia entre las muestras malignas y las benignas y normales radicó en el patrón de expresión; siendo éste en las primeras principalmente M y no apical; en las restantes, restringido a la membrana apical. Por Western Blot, se obtuvieron resultados similares con CT2 y CT33: una banda principal alrededor de 30 kD; con los otros anticuerpos se obtuvo una doble banda mayor de 200 kD. Conclusiones: 1- en el cáncer de mama, MUC1 tiene una mayor expresión con un patrón generalmente mixto y no apical; 2- CT2 y CT33 identifican la misma banda de reacción y 3- el nuevo anticuerpo CT33 es útil para demostrar la presencia de MUC1 en tejidos mamaros normales y neoplásicos.

435. (7154) RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL DURANTE EL CRECIMIENTO DE UN FIBROSARCOMA MURINO. RUGGIERO, RAÚL ALEJANDRO; MEISS, ROBERTO PABLO; BUSTUOABAD, OSCAR DAVID

Academia Nacional de Medicina, División Medicina Experimental, I.I.H.E.M.A. y I.E.O.

La expectativa de atacar el cáncer utilizando terapias inmunológicas se ha basado en la posibilidad de vacunar contra tumores murinos. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que es una cosa muy diferente prevenir la aparición de un tumor que lograr que se rechace por medios inmunológicos cuando éste se ha establecido. Es claro que comprender la naturaleza de esta refractariedad debe ser la base de todo intento racional de inmunoterapia del cáncer. Para entender este problema es necesario analizar lo que ocurre durante el crecimiento de un tumor fuertemente inmunogénico que es el ejemplo que más promesas ofrece para una inmunoterapia eficaz. El modelo elegido fue el fibrosarcoma de ratón MC-C inducido por metilcolantreno. Cuando el tumor MC-C comienza a crecer despierta una respuesta inmune que hemos medido de cuatro maneras: citotoxicidad

in vitro de esplenocitos contra células MC-C marcadas con Cr51, test de Winn, transferencia pasiva de inmunidad e inmunidad concomitante. Todos estos indicadores de respuesta inmune se incrementan a medida que el MC-C crece pero desaparecen cuando el tumor supera los 500mm³. A su vez, en esta etapa de "eclipse inmunológico" todo intento de inmunoterapia fracasa y recíprocamente la transferencia de esplenocitos de ratones en eclipse a ratones inmunes les hace perder a éstos su estado inmune. Por último, el estado de eclipse no pudo ser revertido después de la extirpación del tumor hasta al menos cuatro meses después de la extirpación. Dado que el estado de «eclipse inmunológico» no se revierte por extirpación del tumor, entonces todo intento de inmunoterapia contra células tumorales residuales que hayan quedado en el organismo después de haber reducido la mayor parte del tumor, que es el caso que se presenta en la clínica, está predestinado al fracaso.

436. (7191) IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE LINFOCITOS NATURAL KILLER CD 57+ EN LOS GANGLIOS LINFATICOS REGIONALES DE PACIENTES CON CANCER. LAGUENS, GRACIELA; CORONATO, SILVIA; PORTIANSKY, ENRIQUE; PONZINIBBIO, CARLOS; DI GIROLAMO, VANDA

Cátedra De Patología B, Facultad De Ciencias Medicas UNLP

Las células Natural Killer (NK) son cruciales para el mantenimiento de la vigilancia inmune y constituyen el puente entre inmunidad innata y adaptativa. Estudios recientes han demostrado su presencia en los ganglios linfáticos regionales (GLR) de pacientes con cáncer, donde las NK interactuarían con las células dendríticas (CD) provocando su activación, maduración o su lisis. En estudios previos, habíamos detectado en los GLR de pacientes con neoplasias, una disminución significativa de CD tanto inmaduras como interdigitantes y foliculares (CFD). También encontramos depleción de linfocitos B y una inversión de la relación de CD4+/CD8+. En el presente estudio evaluamos la distribución y cuantificación de células CD57+ consideradas una subpoblación de NK. Estas células se localizan en las zonas claras de los centros germinativos de los ganglios, donde la red de CFD se pone en íntimo contacto con los linfocitos B y T helper. Se estudiaron 26 GLR que drenaban diferentes tipos de carcinomas humanos y 7 ganglios provenientes de pacientes sin patología neoplásica, como controles. En todos ellos se efectuó Inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal CD57. Por medio de un análisis morfométrico digitalizado, se cuantificaron las células CD57+ en ambos grupos. Los valores se obtuvieron de la observación de 5 imágenes en cada uno de los casos. Los datos obtenidos se sometieron a análisis estadístico mediante un test no paramétrico con el siguiente resultado: los GLR de pacientes con cáncer presentaron un promedio de células CD57+ de 62,92 ± 11,90 y los controles: 32,85± 10,67. Los resultados indican que los GLR que drenan tumores presentan un marcado incremento de células NK CD57+ en sus centros germinativos, comparados con los controles (p<0.03). Este hecho, sumado a nuestros hallazgos anteriores, sugiere la presencia de otro mecanismo posible de tolerancia inmune frente al tumor.

437. (7411) TGFβ1 INDUCE LA EXPRESIÓN DE GALECTINA 1 (GAL-1) EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS METASTÁSICAS. RUBINSTEIN, N; DAROQUI, C; ILAGUIRRE, J; VAZQUEZ, P; TOSCANO, M; PURICELLI, L; BAKIN, A; RABINOVICH, G; BAL DE KIER JOFFÉ, E

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas «José de San Martín, Facultad de Medicina Area Investigación, Instituto de Oncología «Angel H. Roffo», Universidad de Buenos Aires.

El sistema TGFβ puede favorecer la progresión maligna. Demostramos que TGFβ aumenta la capacidad proteolítica y motilidad de la línea tumoral mamaria murina LM3, la que se

creta TGFβ y expresa sus receptores. Además de su efecto directo, la promoción de la progresión maligna por TGFβ se ha atribuido a la inducción de inmunosupresión. Se demostró que Gal-1 contribuye a generar un nicho inmunoprivilegiado en el microambiente tumoral, por apoptosis de células T activadas. Nos propusimos estudiar si existía alguna interacción entre el sistema TGFβ y la expresión de Gal-1 en las células LM3. Mediante Western blot observamos que las células LM3 expresan Gal-1 en forma constitutiva y que el tratamiento con TGFβ1 aumenta su expresión en forma dependiente de la dosis. Este efecto no se observó con TGFβ3. Por otra parte, se generaron las líneas estables LM3-5KR y LM3-K277R, mediante transfección de dominantes negativos de los receptores TβRI y II. Esta interrupción de la vía de señalización redujo a nivel basal el aumento de Gal-1 inducido por el tratamiento con 4ng/ml TGFβ1. Mediante análisis de secuencia del gen de Gal-1 hallamos 3 posibles sitios consenso de unión de Smads, con 100% de homología en las posiciones -2801 (Smad4), -810 y +281 (Smad3). En este contexto, observamos que TGFβ induce la traslocación de Smad4 al núcleo a partir de los 30 min, persistiendo hasta los 90 min. A fin de establecer si existía una interacción bidireccional, las células LM3 fueron tratadas con 4ug/ml de Gal-1 y se analizó la expresión de los TGFβ, no encontrándose modulación. TGFβ1, a través de la activación de sus receptores y probablemente de la vía Smad, es capaz de aumentar la expresión de Gal-1 de las células tumorales mamarias metastásicas LM3. Estos resultados sugieren que la interacción entre las moléculas inmunosupresoras TGFβ1 y Gal-1 podría favorecer la progresión maligna a través de generación de un nicho inmunoprivilegiado en el entorno tumoral.

438. (7594) PARTICIPACIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS (PMN) EN EL DESARROLLO DEL TUMOR DE PULMÓN LP07. BENEDETTI, LORENA; STILLITANI, ISABEL; PELUFO, GUILLERMO; KLEIN, SLOBODANKA; DIAMENT, MIRIAM

Dpto. Bioterío y Cáncer Experimental, Instituto de Oncología A.H. Roffo, Fac. Medicina, UBA

Hemos determinado que la depleción in vivo de PMN en portadores de tumor de pulmón murino LP07 sc, reduce significativamente la incidencia y número de metástasis pulmonares, así como la caquexia inducida por el tumor. Los animales deplecionados de PMN presentaron un retardo del crecimiento tumoral respecto del control en fases tempranas del desarrollo tumoral que luego se revertía. Hemos descripto resultados similares con el tratamiento con antiinflamatorios no esteroides, que además reducían el crecimiento del tumor sc. El objetivo de este trabajo fue estudiar la funcionalidad in vitro de los PMN durante la evolución del tumor LP07. Determinamos la acción de medios condicionados de PMN, 5x10⁶ células/mL, (MCPMN) de portadores LP07 y de ratones normales sobre cultivos de LP07. Los PMN fueron obtenidos de cavida peritoneal luego de una estimulación con caseína y purificados por gradientes de densidad. Los MCPMN de ratones normales inhibieron la proliferación in vitro de células LP07 (p<0.006), así como los MCPMN de portadores de LP07 (p<0.02). Se determinó por zimografía la actividad de MMP-2 y MMP-9 en los mismos MCPMN. Los niveles de MMP-9 y de MMP-2 aumentaron 60% y 35% respectivamente en relación al MCPMN normales. Se midieron por ELISA los niveles de IL-1β en los MCPMN, siendo 207±8 pg/mL para MCPMN de portadores y 76±5 pg/mL para MCPMN de ratones normales. Durante el desarrollo del tumor LP07 se observan cambios en la funcionalidad de los PMN que regularían la progresión tumoral, como indica la disminución de la capacidad inhibitoria de los MCPMN sobre la proliferación de las células LP07. El estado de activación reflejado por los niveles más altos de MMPs e IL-1β, se correlacionan con la diseminación metastásica y la inflamación sostenida que presentan los portadores de LP07. En este modelo de tumor de pulmón, los PMN actuarían favoreciendo la progresión tumoral.

439. (7780) CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE GALECTINA-1 (GAL-1) Y SU EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD DE

ESPLENOCITOS EN UN MODELO DE RATAS PORTADORAS DE UN LINFOMA B TRATADAS CON CICLOFOSFAMIDA (CY). RICO, MARÍA J. (1*), ZACARÍAS, MARIANO F. (1*); RUBINSTEIN, NATALIA (2); ILARREGUI, JUAN M. (2); TOSCANO, MARTA A. (2); RABINOVICH, GABRIEL A. (2); SCHAROVSKY, O. GRACIELA (1)

(1) *Inst. Genética Exp. Fac. Cs. Médicas, U.N.R., Rosario;* (2) *Lab. Inmunogenética, Hosp. Clínicas, UBA. *Contribuyeron igualmente*

Previamente demostramos que una dosis única y baja de Cy tiene efecto antimetastásico sobre ratas portadoras del linfoma B (L-TACB) y que Gal-1 participaría en el escape tumoral de la respuesta inmune en este modelo. Se estudió la cinética de expresión de Gal-1 en bazo, tumor 1° y metástasis y el efecto de Gal-1 sobre viabilidad de esplenocitos en ratas portadoras de L-TACB tratadas con Cy. Ratas se desafiaron con L-TACB s.c. (día 0) y se distribuyeron en dos grupos: I) sin tratamiento y II) tratadas (día 14) con Cy i.p. (10 mg/kg). Se midió el tamaño tumoral y se sacrificaron ratas del grupo I) días 0, 7, 14 y 19 y del grupo II) día 19 extirpándose tumor, bazo y metástasis (n=4/día). Se determinó la expresión de Gal-1 por Western Blot en los tejidos extirpados que fue: en tumor 1°, día 19, mayor que en día 7 ($p < 0.05$), observándose lo inverso en bazo ($p < 0.05$); en tumor tratado con Cy, día 19 (II-19) menor que en I-19 ($p < 0.05$); en bazo II-19, mayor que I-19 ($p < 0.05$) y en metástasis fue menor que en tumor 1° ($p < 0.001$). Suspensiones de esplenocitos de bazos (día 19) de ratas portadoras de L-TACB tratadas con Cy (10 mg/kg) en el día 14 (i) y sin tratar (ii), se incubaron 96h con 4 (A) ó 0mg/ml de Gal-1(B). Se determinó la viabilidad de los esplenocitos y se observó que: en (ii)-A fue menor que en (ii)-B ($p < 0.05$) y no difirió entre (i)-A y (i)-B; en (i)-A fue mayor que en (ii)-A ($p < 0.05$) y en (i)-B fue mayor que en (ii)-B ($p < 0.05$). La expresión de Gal-1 aumenta durante la progresión tumoral. La disminución de Gal-1 en metástasis sugeriría competencia con moléculas del fenotipo metastásico por moléculas de las vías de expresión. Cy restablece los niveles basales de Gal-1 en bazo. Gal-1 no revierte el incremento de la viabilidad de esplenocitos inducida por Cy, la cual modularía las vías de apoptosis utilizadas por Gal-1.

INMUNOLOGÍA 8: INMUNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

440. (6657) ESTABLECIMIENTO DE LA PREÑEZ TEMPRANA EN EL SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO. ROL DE LA N-N'DIMETIL BIGUANIDA: METFORMINA. LUCHETTI, CAROLINA; SOLANO, EMILIA; SANDER, VALERIA; ELÍA, EVELIN; DI GIROLAMO, GUILLERMO; GONZALEZ, CLAUDIO; MOTTA, ALICIA B

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO); Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA

En trabajos previos vimos que la inducción de poliquistosis ovárica (PCOS) con dehidroepiandrosterona (D) en ratones preñados producía reabsorción embrionaria (RE). El objetivo de este trabajo fue estudiar la regulación de metformina (M): N-N'dimetil biguanida sobre aspectos inmunes de la preñez temprana con PCOS. Ratones preñados fueron inyectados sc con D (6 mg/100 g de peso) 24 y 48 h post implantación (p/i): día 5, (grupo D). Otro grupo fue inyectado con D y además tratado en forma oral con M: 50 mg/Kg peso (grupo D+M), ambos administrados 24 y 48 h p/i. El grupo control (grupo C) recibió vehículo en iguales condiciones. Los animales se sacrificaron a las 24 h del último tratamiento. El grupo D presentó un 86% de reabsorción embrionaria (RE) mientras que en el grupo D+M fue del 47%. Los animales pertenecientes al grupo D mostraron niveles menores de progesterona (P) y estradiol (E) séricos y la M revirtió este efecto (C=10±2; D=5±1; D+M=9±2 ng/ml y C=518±143;

D=218±40; D+M=621±98 pg/ml respectivamente). La expresión de linfocitos T CD4+ en ganglios drenantes de ovario (determinados por citometría de flujo) fue mayor que la de T CD8+ y se mantuvo en los tres grupos: en % T CD4+ y CD8+: C=63±3 y 37±2; D=57±4 y 43±3; D+M=58±2 y 42±4. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), citoquina que elevada provoca reabsorción embrionaria fue evaluada en suero por RIA. El grupo D presentó aumento de TNF α . Cuando M revirtió este efecto los ratones continuaron preñados (C=80±15; D=118±14; D+M=74±15 pg/ml suero), por eso el grupo D+M con RE presentó niveles de TNF α incrementados respecto de los controles (95±16pg/ml). La M previene la disminución de P y E que, dada en el período perimplantatorio produce RE. La androgenización no modificó la expresión linfocitaria T de ganglios drenantes de ovarios durante la preñez temprana. La M fue capaz de regular los niveles de TNF α , los cuales a su vez se relacionaron directamente con la RE.

441. (6674) ROL DIFERENCIAL DE GALECTINAS-1 Y -3, PROTEÍNAS INMUNOREGULATORAS, EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL BLOIS, SANDRA MARIA; ILARREGUI, JUAN; TOMETTEN, MAREIKE; RUBINSTEIN, NATALIA; TOSCANO, MARTA; RABINOVICH, GABRIEL; ARCK, PETRA

Division of Immunogenética, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Las galectinas constituyen una familia de lectinas endógenas con afinidad por azúcares β -galactósidos. Recientes evidencias sugieren que Gal-1 posee un importante efecto inmunosupresor induciendo una polarización tipo Th2 en la respuesta inmune. Por el contrario, Gal-3 es capaz de estimular un perfil de citoquinas proinflamatorias. El objetivo del reciente estudio fue investigar el rol de Gal-1 y -3 durante la gestación murina (normal y bajo condiciones de estrés como inductor de una situación patológica). Hembras CBA/J con tapón vaginal fueron separadas y divididas en los siguientes grupos: control (recibió inyección i.p. de PBS en los días 5.5 y 6.5 de la gestación (dg)); estrés (recibió estrés sónico durante 24 horas comenzando el dg 5.5 y dos inyecciones de PBS); estrés-Gal-1 (recibió estrés e inyección i.p. de recombinante Gal-1(10 μ g/dg)); estrés-Gal-3 (recibió estrés e inyección de oligonucleótido antisentido para Gal-3 (7.5mg/kg/dg)). Las hembras de los diferentes grupos fueron sacrificadas durante días 7.5 y 13.5 de la gestación, donde se analizó el % de abortos y el perfil de citoquinas en la interfase materno-fetal. El tratamiento de estrés durante la gestación provocó un significativo aumento en el % de abortos (31.1 \pm 3.3) con respecto al grupo control (12.0 \pm 2.8). El % de aborto fue reducido por el tratamiento con Gal-1 (8.4 \pm 2.6) y antisentido Gal-3 (10.7 \pm 2.3) en los animales estresados previamente. La relación Th1/Th2 en la interfase materno fetal fue significativamente menor en los grupos tratados con Gal-1 o antisentido Gal-3 respecto al grupo estrés ($p < 0.05$). Nuestros resultados in vivo sugieren que Gal-1 es un factor involucrado en la generación de privilegio inmunológico y una respuesta Th2 durante la gestación, mientras que Gal-3 tendría un rol proinflamatorio modulando la respuesta hacia un perfil Th1, contribuyendo de este modo a un nuevo paradigma en la interfase materno-fetal.

442. (6704) REGULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA PREÑEZ TEMPRANA Y SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO. LA METFORMINA (N-N'DIMETIL BIGUANIDA) COMO TRATAMIENTO. SOLANO, EMILIA; LUCHETTI, CAROLINA; SANDER, VALERIA; ELÍA, EVELIN; DI GIROLAMO, GUILLERMO; GONZALEZ, CLAUDIO; MOTTA, ALICIA B

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO); Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA

El rol de la metformina (M): N-N'dimetil biguanida en parámetros del estrés oxidativo ha sido demostrado en otros sistemas. El objetivo del trabajo fue estudiar si la M era capaz de

regular el estrés oxidativo durante la preñez temprana con Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS) evitando así la reabsorción embrionaria (RE). Ratones preñados fueron inyectados sc con D (6 mg/100 g de peso) 24 y 48 h post implantación (p/i); grupo D. El grupo D+M fue inyectado con D y tratado en forma oral con M: 50 mg/Kg peso 24 y 48 h p/i. El grupo control (grupo C) recibió vehículo en iguales condiciones. Los animales se sacrificaron a las 24 h del último tratamiento. El grupo D presentó un 60% de RE, mientras que el grupo D+M el 10%. Esto se correlacionó con la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en útero ($C=0,36\pm 0,06$; $D=0,21\pm 0,06$; $D+M=0,39\pm 0,02$ pmol/g.min). La morfología ovárica, evaluada por tinción con hematoxilina eosina y Hoescht, se vio alterada en D y se normalizó en el grupo D+M. En ovario evaluamos el balance oxidativo por cuantificación del índice de peroxidación lipídica: formación de malondialdehído (MDA) y como antioxidantes: actividad de la catalasa (CAT) y la formación de glutatión (GSH). Encontramos que la M revirtió el aumento de MDA producido por D ($C=2,6\pm 0,6$; $D=4,0\pm 0,8$; $D+M=2,5\pm 0,2$ nmol MDA/mg proteína). Además la M revirtió la disminución de CAT producida por D ($C=0,50\pm 0,03$; $D=0,25\pm 0,04$; $D+M=0,42\pm 0,04$ pmoles/mg proteína). Mientras que los niveles de GSH disminuyeron en el grupo D, el tratamiento con M restituyó los valores normales ($C=7,7\pm 0,9$; $D=3,8\pm 1,0$; $D+M=6,5\pm 0,6$ nM/ mg proteína). Concluimos que la androgenización con D durante la preñez temprana produce RE y disminución de la actividad de la NOS, conocida reguladora del desarrollo placentario. Los animales con RE presentaron desbalance oxidativo. La M logró revertir la RE, normalizando todos estos parámetros.

443. (6933) RESPUESTA DE LINFOCITOS PERIFÉRICOS A MITÓGENOS Y PROGESTERONA EN LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA GESTACIÓN PORCINA. CUELLO, FERNANDA (1); GROSSO, CAROLINA (1); MARTÍNEZ, RAMIRO (1); VIVAS, ADRIANA (1); GRECO, CECILIA (2)

Lab. de Radioisótopos, Dpto. Anatomía Animal, Fac. de Agronomía y Veterinaria, UNRC. (1) Anatomía Animal, FAV; (2) Microbiología e Inmunología, FCEFQyN, UNRC

Se ha descrito que hay una modulación de la respuesta inmune en el periodo peri-implantacional para facilitar la sobrevivencia embrionaria. Además, se conoce que la progesterona (P) tiene acción inmunomoduladora que podría favorecer el proceso de implantación. Por ello, el objetivo de este trabajo fue investigar la proliferación in vitro de linfocitos periféricos estimulados con Con-A, PHA-M y P de cerdas en las primeras etapas de la gestación. Se cultivaron linfocitos periféricos de cerdas Landrace x Yorkshire vacías y de 10 (prel) y 30 días (post) de gestación sin y con 25 µg/ml de PHA-M, 5 µg/ml de Con-A y 0,2 y 0,4 µg/ml de P durante 72 horas a 37°C con 5% de CO₂. Las concentraciones de mitógenos y de la hormona fueron establecidas por trabajos previos en nuestro laboratorio mediante una curva dosis-respuesta. Se midió la incorporación de T [3H] y se calculó el Índice de Estimulación Linfocitaria (IEL) considerándose valores > 0,5 indicativos de estimulación. El IEL en prel y post con Con-A fue $0,85 \pm 0,18$ y $0,80 \pm 0,21$ respectivamente. Con PHA-M el IEL alcanzó valores indicativos de estimulación menores que Con-A. Para ambos mitógenos no se observaron diferencias significativas con los IEL de cerdas vacías. Con 0,2 µg/ml de P los IEL tanto en prel como post fueron significativamente menores que los de cerdas vacías ($p < 0,01$). Lo mismo ocurrió con 0,4 µg/ml de P. Con las dos concentraciones de la hormona se observó una disminución altamente significativa de los valores de IEL en el periodo pre-implantacional con respecto al post-implantacional ($p < 0,001$). Estos resultados muestran que durante la gestación porcina no hay alteración de la respuesta inmune celular, a diferencia de lo que ocurre en humanos y murinos. La inmunosupresión inducida por P sería mayor en el periodo pre-implantacional.

444. (7079) ESTUDIO DE LOS EFECTOS INMUNOMODULADORES INVOLUCRADOS EN LA MULTIPARIDAD: I-ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE M-CSF Y G-CSF EN

PLACENTA MURINA. LITWIN, S; LAGADARI, M; MARGNI, R; MIRANDA, S

IDEHU (Instituto de Estudios en Inmunidad Humoral) CONICET UBA

En trabajos previos demostramos que placentas provenientes de hembras múltiparas pertenecientes a una cruce singénea de ratones mostraban un incremento en el número de macrófagos. Con el objeto de investigar los mecanismos inmunomoduladores que juegan en la multiparidad y considerando que M-CSF y G-CSF inducen una diferente actividad biológica en macrófagos, en este trabajo hemos analizado la expresión placentaria de dichos factores. Se emplearon tres grupos de ratones CBA/J x CBA/J: PJ (Primíparas Jóvenes: $3,0 \pm 0,5$ meses, $n=9$); PV (Primíparas Viejas: $8,5 \pm 0,5$ meses, $n=8$) y MV (Múltiparas Viejas: $8,5 \pm 0,5$ meses, con 3 a 4 gestaciones previas, $n=9$). La expresión de M-CSF y G-CSF fue analizada por inmunohistoquímica. De acuerdo al número de células positivas, los resultados fueron expresados con valores de 0 a 4, determinándose su significación estadística. Se analizó además la expresión de CK (citoqueratina) y se realizaron tinciones con PAS. Los resultados obtenidos indicaron que los tres grupos presentaban un patrón de tinción similar para M-CSF en todo el trofoblasto, mientras que la expresión de G-CSF fue superior sólo en el espongiotrofoblasto en el lote MV ($p < 0,001$). Además, todas las placentas MV presentaron entre 5 y 11 capas de células pequeñas adyacentes a la decidua. En cambio, células equivalentes en los lotes PJ y PV constituían una monocapa. Estas células probaron ser CK+ y, en el caso del lote MV, las capas más cercanas a la decidua fueron PAS+ y mostraban una expresión mayor de G-CSF y M-CSF que la observada en las monocapas de los lotes PJ y PV ($p < 0,001$, para ambos factores), sugiriendo que podrían tratarse de células trofoblásticas intersticiales, un tipo especial de trofoblasto invasivo. Este trabajo constituye la primera evidencia experimental que demuestra que la multiparidad incrementa la invasión trofoblástica. Sugerimos que las células trofoblásticas invasoras podrían favorecer el reclutamiento de macrófagos al trofoblasto modulando su actividad.

445. (7085) ESTUDIO DE LOS EFECTOS INMUNOMODULADORES EN LA MULTIPARIDAD: II-ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VEGF EN PLACENTA MURINA. BARRIENTOS, G; LITWIN, S; MARGNI, R; MIRANDA, S

IDEHU (Instituto de Estudios en Inmunidad Humoral) CONICET UBA

En trabajos previos demostramos que placentas provenientes de hembras múltiparas de la cruce de ratones CBA/J x CBA/J mostraban un mayor número de macrófagos ubicados entre trofoblasto y decidua materna y un notable incremento de la invasión trofoblástica sobre tejido decidual materno respecto de lo observado en placentas de hembras primíparas. Considerando que el tejido invasivo trofoblástico podría regular el proceso de angiogénesis y vasoregulación en interfase materno-fetal, en este trabajo analizamos la expresión de VEGF en el modelo de ratón mencionado. Para ello, hemos empleado tres grupos de ratones CBA/J x CBA/J: PJ (Primíparas Jóvenes: $3,0 \pm 0,5$ meses, $n=9$); PV (Primíparas Viejas: $8,5 \pm 0,5$ meses, $n=8$) y MV (Múltiparas Viejas: $8,5 \pm 0,5$ meses, con 3 a 4 gestaciones previas, $n=9$). Las placentas fueron obtenidas entre los días 18-20 de gestación. Las características histológicas fueron observadas en secciones teñidas con hematoxilina. La expresión de VEGF fue analizada en el tejido placentario por inmunohistoquímica. De acuerdo al número de células positivas, los resultados fueron expresados con valores de 0 a 4, determinándose su significación estadística. Los resultados obtenidos indicaron que los tres grupos no mostraron diferencias significativas en la expresión de VEGF en espongiotrofoblasto ($p > 0,1$) y en laberinto trofoblástico ($p > 0,1$). Sin embargo la expresión de VEGF apareció notablemente incrementada en las multicapas de células del trofoblasto invasivo del lote MV en relación a la observada en los lotes PJ ($p < 0,001$) y PV ($p < 0,001$). Los resultados obtenidos nos per-

miten concluir que la multiparidad incrementa la producción de VEGF por parte del tejido trofoblástico invasivo, pudiendo este hecho favorecer el proceso de angiogénesis. Sugerimos que los macrófagos placentarios, reclutados en alto número en hembras multiparas hasta las cercanías de la decidua materna, podrían actuar como posibles moduladores de esta acción a través de su propia síntesis de VEGF.

446. (7094) INMUNOGLOBULINAS AVIARIAS EN LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE LA PREÑEZ EN PORCINOS. GROSSO, C. (1); CUELLO, F. (1); MARTÍNEZ, R. (1); SCHADE, R. (3); GRECO, C. (2); VIVAS, A. (1)

Laboratorio de Radioisótopos, Dpto. de Anatomía Animal, Facultad Agronomía y Veterinaria, UNRC; ¹ Anatomía Animal; ² Microbiología e Inmunología UNRC; ³ Instituto Charité, Berlin.

El uso de anticuerpos policlonales (pAc) obtenidos a partir de la yema del huevo (IgY) es una herramienta biotecnológica aplicada al diagnóstico o terapéutica que ha tenido un gran auge en los últimos años. Algunas ventajas de estos Ac son su alta afinidad, ausencia de reactividad cruzada con proteínas mamíferas, mayor rendimiento (100 a 250 mg/huevo) y mínimo maltrato a los animales. La distancia filogenética entre aves y mamíferos permite a estos Ac reconocer un mayor número de epítopes que los Ac mamíferos. Desde hace varios años investigamos en porcinos el Factor Precoz de Preñez (EPF), una proteína específica de la gestación, de bajo PM (29 kDa) detectada en suero a las 72 hs post-fertilización y durante toda la preñez. El objetivo de este trabajo fue obtener IgY anti-EPF, evaluar su especificidad y su capacidad de detectar EPF en sueros de cerdas de diferentes estadios de gestación y no preñadas. Gallinas de postura fueron inmunizadas con EPF obtenido a partir de suero de cerda de 7 días de gestación el cual fue sometido a SDS-PAGE preparativa y la banda correspondiente a 29 kDa fue cortada y utilizada como inmunógeno. Se recolectaron los huevos y las IgY anti-EPF fueron separadas de la yema por precipitación combinando Polietilenglicol 6000 y Ácido Caprílico. La especificidad de los Ac fue evaluada por Dot Blot y Western Blot. Los resultados obtenidos en el Dot Blot indican que las IgY anti-EPF reconocen la proteína en estudio en suero de cerdas de diferentes estadios de gestación. En el Western Blot se puede observar que el Ac marca la banda de peso molecular estudiada en los sueros de cerdas preñadas en diferentes estadios de gestación y no así en suero de cerdas vacías. Estos resultados indican que los anticuerpos aviares serían adecuados para ser utilizados en el desarrollo de un equipo para diagnóstico de preñez temprana en porcinos.

447. (7611) INCREMENTO DE CÉLULAS TCR GAMMA-DELTA Y CD8 ALFA EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL LUEGO DE LA TERAPIA CON CELULAS DENDRÍICAS (CD). MIRANDA, SILVIA; BLOIS, SANDRA; LITWIN, SILVANA; BARRIENTOS, GABRIELA; MARGNI, RICARDO

IDEHU (CONICET - UBA)

El desarrollo del nuevo ser involucra mecanismos de tolerancia, donde generalmente el feto semi-alógeno no es rechazado por su madre. Por otro lado, las CD en los últimos años han sido blanco en numerosos estudios por su participación en procesos de tolerancia. Recientes evidencias sugieren que la preinoculación con CD singéneas portadoras de antígenos paternos provoca una disminución en el índice de resorción fetal (IRF) en la cruce CBA/J x DBA/2J. El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto inmunomodulador de las CD en la interfase materno fetal. Para ello, se generaron CD a partir de médula ósea de hembras CBA/J, se incubaron con proteínas solubles de DBA/2J y se purificaron empleando un gradiente de BSA. El análisis de FACS determinó que las CD generadas pertenecían al linaje mielóide. Estas células fueron inoculadas en hembras CBA/J (4 a 7 x 10⁶ células) por vía ev los días 9 y 1 previos al apareo con machos DBA/2 (lote D, n=5) o fueron reemplazadas por medio de cultivo (lote C, n=5). El día 18 de la gestación, se de-

terminó el IRF y se analizó en interfase materno-fetal la expresión de TCR gamma-delta y CD8 alfa por IHQ. De acuerdo al número de células positivas, se informaron valores entre 0 y 4. Los resultados obtenidos indicaron que la magnitud de expresión de ambos marcadores y el IRF siguen una correlación inversa, p<0.001 (Para IRF< 10%: TCR gamma-delta: 11.2±4.0 y CD8 alfa: 7.0±3.5; para IRF entre 25 y 33%, TCR gamma-delta y CD8 alfa, no fueron detectadas). Nuestros datos sugieren que la disminución del IRF inducida por terapia con CD podría estar mediado por la inducción de células regulatorias como CD8 alfa y TCR gamma-delta, ambas protectoras durante la gestación en mamíferos.

448. (7975) RANTES: UN NUEVO INMUNOMODULADOR DE LA RESPUESTA ALOGÉNICA MATERNA. RAMHORST, ROSANNA (1); GUTIERREZ, GABRIELA (2); MARGNI, RICARDO (2); FAINBOIM, LEONARDO (1)

Lab. Inmunogenética, Htal de Clínicas, José de San Martín, UBA.; (2) IDEHU, UBA.

Estudios previos involucraron a las citoquinas y a las quimioquinas en la patogénesis de los abortos recurrentes espontáneos (ARE). Recientemente demostramos que los niveles séricos de RANTES (regulated on activated T cells expressed and secreted) en mujeres con ARE están disminuidos significativamente en comparación con los de mujeres fértiles. Mas aún, RANTES actuó como un factor bloqueante del cultivo mixto linfocitario, suprimiendo la respuesta proliferativa induciendo apoptosis de células CD45R0+ y modulando la expresión de Bcl-2. Basados en los presentes resultados, investigamos los niveles de RANTES durante el embarazo en el modelo murino de abortos recurrentes CBA x DBA/2. Para ello se determinaron por ELISA los niveles de RANTES en el suero y en las unidades fetoplacentales de la cepa con alta tasa de resorción CBA x DBA/2 y se los comparó con los de la cepa CBA x BALB-c y BALB-c x BALB-c (controles normales). Además se estudiaron los niveles séricos en hembras CBA y BALB-C nulíparas, primíparas y multiparas. Así, se evidenció que los niveles séricos de RANTES en hembras CBA nulíparas estaban significativamente disminuidos en comparación con su contraparte BALB-C (p<0,05). Por otra parte las hembras nulíparas con cruce abortadora CBA x DBA/2 presentaron niveles de RANTES séricos significativamente disminuidos en comparación con las cruces normales CBA x BALB-c o BALB-c x BALB-c a los 6,5 días post implantación y 9.5 días luego de la vascularización placental (p<0,05). Además, los niveles séricos de RANTES estaban aumentados significativamente en las hembras CBA x DBA/2 múltiparas mientras la tasa de abortos en estos animales fue menor que en las hembras primíparas CBA x DBA/2. Las hembras CBA tendrían niveles séricos deficientes de RANTES los cuales aumentarían durante el embarazo y con la paridad. La alta tasa de resorción en hembras CBA x DBA/2 podrían relacionarse con los niveles de esta beta-quimioquina.

INMUNOLOGÍA 9: INMUNIDAD CONTRA VIRUS, HONGOS Y PARÁSITOS

449. (6789) EXPRESIÓN DE L-SELECTINA SOBRE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS CD4 EN NIÑOS HIV(+). GADDI, EDUARDO; BALBARYSKI, JEANETTE; RAIDEN, SILVINA; SVARTZ, ALEJANDRA; QUIROZ, HÉCTOR; CANTISANO, CLAUDIO; GIRAUDI, VERA

Hospital Pedro de Elizalde

Los linfocitos TCD4 (LTCD4) naive migran preferentemente hacia los órganos linfáticos secundarios en donde el encuentro con el antígeno induce su proliferación, diferenciación y adquisición de funciones efectoras. Ellos utilizan la expresión de L-selectina (CD62L) para facilitar la inmunovigilancia sin embargo su expresión también aparece sobre células CD4 de memoria. Durante el curso

de la infección por HIV la acción viral no sólo es responsable de la pérdida acelerada de células CD4 sino también de las alteraciones observadas en los niveles y capacidades funcionales de las células naive, efectoras y de memoria. El inmunofenotipo naive, efector o memoria fue identificado sobre los LTCD4 de sangre periférica en 58 niños HIV (+) en distintos estadios inmunológicos (1: CD4 > 25%, 2: CD4: 15-25%, 3: CD4: < 15%), recibiendo tratamiento antirretroviral, y en un grupo control (Co) de 20 niños sanos HIV(-). Se realizó una inmunomarcación con 3 fluorocromos usando anticuerpos monoclonales antiCD45RA (FITC), CD62L (PE) y CD4 (PerCP). El porcentaje de coexpresión CD45RA+/CD62L+ sobre los LTCD4 de los 58 niños HIV(+) fue 46±16,8, significativamente disminuido ($P < 0.05$) frente al grupo Co sano, 59,4±7,4. Asimismo el porcentaje de LTCD4 con fenotipo naive se encontró significativamente disminuido en los niños en estadio 3: 29,5±14,5, con respecto a los niños en estadio 2: 43,6±13,4 y al estadio 1: 56,4±13,2. Se encontró una marcada correlación inversa entre el número de LTCD4 y el porcentaje de LTCD4 con fenotipo memoria CD45RA-/CD62L+ ($r: -0.65$, $P < 0.05$). Las células CD4+CD45RA+CD62L+ representan un grupo de linfocitos T emigrados recientemente del timo y no previamente activados. Su menor expresión en niños HIV+ con mayor compromiso inmune indicaría la menor capacidad del sistema inmunológico para reaccionar apropiadamente ante el desafío con antígenos nuevos.

450. (6859) NIVELES DE LINFOCITOS B(LBCD19) Y B1(CD19/CD5) DURANTE EL SEGUIMIENTO DE NIÑOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA(IRAB) POR VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO(VSR). BALBARYSKI, JEANETTE; GADDI, EDUARDO; QUIROZ, HÉCTOR; RAIDEN, SILVINA; CANTISANO, CLAUDIO; CANDI, MARCELA; GIRAUDI, VERA

Hospital Pedro de Elizalde

Los linfocitos BCD19/CD5+, B1, son células con capacidad de autorenovación, predominan en la vida fetal, constituyen una pequeña fracción de los LB durante la vida adulta y están asociados con la producción de anticuerpos naturales, independiente de las células T. La expresión de CD5 sobre los LB puede incrementarse por varios agentes activantes, lo cual sugeriría que esta glicoproteína funcionaría como un activador celular. Se estudiaron 14 niños menores de 24 meses con IRAB por VSR. Los mismos fueron evaluados al inicio de la infección, confirmada por antigenemia positiva, clínica y radiología. Previo al alta clínica se valoró nuevamente su estado inmunológico. Con fines comparativos se incluyó un grupo control de 10 niños sanos en el mismo intervalo etario. Se estudió el inmunofenotipo linfocitario ensayando anticuerpos monoclonales específicos para CD45, 3, 5 y DR (FITC) y CD4, 8, 16-56 y 19 (PE). Tanto los valores porcentuales como absolutos de LBCD19 disminuyeron en forma significativa ($P < 0.05$) entre los momentos inicial (i) y final (f) del seguimiento, CD19 i: 50%, CD19 f: 17%, CD19i: 1840/mm³, CD19f: 510/mm³. La subpoblación CD19/CD5 registró un comportamiento similar CD19/CD5i: 4%, CD19/CD5f: 2%, CD19/CD5i: 168/mm³, CD19/CD5f: 53/mm³. A diferencia de los LB, los valores porcentuales y absolutos de LTCD3 y LTCD8 registraron un aumento significativo ($P < 0.05$) entre ambos momentos, CD3i: 38%, CD3f: 71%, CD3i: 1448/mm³ CD3f: 2047/mm³, CD8i: 17%, CD8f: 26%, CD8i: 510/mm³ CD8f: 742/mm³. Al momento del alta clínica todos los pacientes presentaron niveles en las distintas subpoblaciones linfocitarias que no diferían de los del grupo control. La normalización en los niveles de células B1 observada en paralelo con el alta clínica, indicaría el grado de participación de la inmunidad innata en el control inicial de la infección respiratoria hasta el completo desarrollo de la respuesta inmune adaptativa.

451. (6886) ESTUDIO CINÉTICO DE LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAHEPÁTICOS (LIH) DURANTE LA INFECCIÓN POR C.ALBICANS. IMPLICANCIAS EN LA PATOGENIA DE LA INFECCIÓN. RENNA, MS; CORREA, S; PORPORATTO, C; PARAJE, G; SOTOMAYOR, C

Inmunología. CIBICI. FCQ. UNC

El compartimiento linfocitario intrahepático constituye una población heterogénea que puede estar involucrada tanto en mecanismos de protección como de injuria hepática. Durante la diseminación de *C.albicans* de origen intestinal, el hígado actúa como barrera de control. El objetivo de este trabajo fue determinar la cinética de reclutamiento temprana de LIH y su rol en los mecanismos hepatotóxicos observados en nuestro modelo. Para ello, ratas Wistar normales (N) o infectadas (Ca)(ip-3x10⁸lev) se estudiaron a 1, 2 y 3 días post-infección. La población de LIH fue purificada mediante gradiente de percoll y evaluada por FACS. En una primera etapa se determinó el % y nº absoluto (Ab) de LIH totales (t) y de las subpoblaciones CD3+, NK+ y NKT+. Se observó un marcado incremento, porcentual y Ab, en el reclutamiento de LIHt en el grupo Ca ($p < 0.05$), siendo los cambios más significativos al día 2 de la infección. Mientras que las células NK estuvieron incrementadas en el día 1 ($p < 0.05$), las subpoblaciones CD3+ y NKT+ presentaron la máxima diferencia en el día 2 post-infección ($p < 0.05$). Debido a que los hepatocitos expresan en forma constitutiva la molécula Fas y que en nuestro modelo se observa una franca injuria y apoptosis intrahepática temprana durante la infección, estudiamos la correlación entre estos hallazgos y el comportamiento cinético de células que expresan la molécula Fas-Ligando. La expresión de Fas-L evaluada durante los tres días de estudio, mostró aumentos significativos en la población LIH total ($p < 0.05$ para % y valor Ab), y en la población CD3+Fas-L+ (66,18 vs 77,10%; 1,8x10⁷ vs 6,30x10⁷/hig/ml) ($p < 0.05$) 2 días posteriores a la infección por el hongo. Estos hallazgos muestran un cambio dinámico en las subpoblaciones reclutadas como consecuencia de la colonización hepática de *C. albicans*. La expresión de Fas-L en estas poblaciones sugiere su participación en los mecanismos de apoptosis temprana observada en este modelo.

452. (6888) CARACTERIZACIÓN DEL DESBALANCE NEUROENDÓCRINO EN RATAS INFECTADAS CON CÁNDIDA ALBICANS Y EXPUESTAS AL ESTRÉS. PORPORATTO, CARINA; TOSCANO, NATALIA; SOTOMAYOR, CLAUDIA E; CANO, ROXANA; CORREA, SILVIA G

Inmunología. CIBICI. FCQ. UNC

La infección, la injuria y la inflamación se caracterizan por un balance energético negativo con anorexia, pérdida de peso y aumento de la termogénesis del que participan citoquinas y hormonas como la leptina. Ratas Wistar infectadas con *C. albicans* y expuestas al estrés durante 3 días experimentan una marcada disminución del peso corporal y variaciones en la celularidad del hígado, bazo y timo. Para establecer el mecanismo del desbalance metabólico en este modelo realizamos el estudio cinético (días 1-3) de distintos parámetros inmunes (IL-6 e L-10; ELISA), neuroendócrinos (insulina; RIA y leptina; ELISA) y bioquímicos (glucosa; kit enzimático). Además, en el día 3, estudiamos en hígado los niveles de la proteína de señalización STAT-3 fosforilada, estimulada por IL-6 y leptina (Western blot e inmunocitoquímica). Ratas (4-6) de los grupos Normal (N), Estrés (E), Infectados (Ca) e Infectados y Estresados (CaE) se sacrificaron diariamente para obtención de suero y tejidos. Los cambios más pronunciados en los parámetros estudiados se observaron en el día 3 con aumento en los niveles de IL-6 en el grupo Ca ($p < 0.05$), disminución en los niveles de leptina en los grupos E, Ca y CaE que fue más marcada en los grupos estresados E y CaE ($p < 0.01$) y disminución en la glucemia en CaE ($p < 0.001$). No se observaron cambios en los niveles de IL-10 ni de insulina durante los días del estudio. Los niveles de STAT-3 fosforilada estuvieron disminuidos en el grupo CaE. Estos resultados muestran un pronunciado desbalance metabólico en ratas expuestas al estrés y a la infección. Teniendo en cuenta que la producción de leptina está fuertemente condicionada por el estado nutricional del huésped y que existe una correlación entre los niveles de leptina y la inmunocompetencia, la escasa producción de citoquinas de fase aguda como la IL-6 y de hormonas como la leptina en las etapas iniciales de la infección

favorecería la deficiente respuesta de la inmunidad innata observada en este modelo.

453. (7370) TRICHINELLOSIS: IMPORTANCIA DE LA RESPUESTA PULMONAR TEMPRANA EN LA PROTECCIÓN DEL HOSPEDADOR. VERZOLETTI, M. LAURA (1); FORASTIERO, A. (1); COSTANTINO, S. (1); ROUX, M.E. (2); VENTURIELLO, S.M. (1)

(1) *Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.*; (2) *Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.*

Dado que se postula al pulmón como un órgano de atrapamiento de parásitos, el objetivo de este estudio fue caracterizar las alteraciones histopatológicas e inmunológicas de dicho órgano y su implicancia en la defensa del hospedador durante una infección por *Trichinella spiralis*. Se obtuvo lavado broncoalveolar (BAL) y órganos del tracto respiratorio bajo de ratas Wistar infectadas al día 6 y 14 post-infección (pi). Sobre cortes histológicos se realizaron técnicas histoquímicas (H&E, PAS y Giemsa) e inmunohistoquímicas (inmunofluorescencia/IF) con el fin de evaluar diferentes poblaciones celulares, particularmente aquellas presentes en el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT). En el fluido del BAL (BALF) se determinaron IgE e IgA totales por ELISA y anticuerpos (Acs) anti-larva migrante (Lm) por IF. Se analizó la actividad biológica del BALF y de las células del BAL por ensayos in vitro de citotoxicidad en presencia o ausencia de Acs. Resultados: A ambos días pi, se observó hiperplasia del BALT y de las células caliciformes; además se detectaron eosinófilos y mastocitos dispersos en el parénquima pulmonar. Al día 6 pi se observó diferencia significativa ($p < 0.001$) con el lote control en el N° células/15 campos en las poblaciones: IgE+ (401 ± 8 vs 259 ± 27); LT CD4+ (528 ± 65 vs 185 ± 18) y CD5+ (684 ± 77 vs 333 ± 19). Al día 14 pi se mantuvo la diferencia significativa en la población celular IgE+; en BALF se observó un incremento del nivel de IgE total (18.0 ± 3.5 vs 4.1 ± 0.4 ng) y se detectaron IgA e IgE anti-Lm. Las células del BAL presentaron actividad citotóxica, aún en ausencia de Acs (20.7 ± 3.8 vs $3.4 \pm 0.5\%$ mortalidad). Los Acs presentes en el BALF no mostraron adherencia ni mortalidad utilizando células de BAL de ratas normales. El pulmón, al estar sensibilizado previo al pasaje de las Lm de *T. spiralis* y al generar una respuesta efectora in situ, actuaría como órgano de destrucción parasitaria, permitiendo el pasaje de aquellas larvas que desarrollen mecanismos de evasión.

454. (7680) ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE GALECTINA-3 EN INFECCIONES INTRACELULARES MURINAS. TOSCANO, MARTA; TONGREN, ERIC; DE SOUZA, BRIAN; SANOS, STEPHANIE; KAYE, PAUL; RILEY, ELEANOR; RABINOVICH, GABRIEL

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas «José de San Martín». Facultad de Medicina. UBA.; London School of Hygiene and Tropical Medicine. University of London

Galectina-3 (Gal-3) es una proteína de unión a β -galactósidos que presenta numerosas propiedades inmunomoduladoras tales como la regulación de la proliferación, producción de anticuerpos y citoquinas. El objetivo del presente estudio fue evaluar la relevancia de Gal-3 en la progresión de infecciones intracelulares murinas. A tal fin ratones deficientes en Gal-3 (gal-3^{-/-}) fueron desafiados con parásitos intracelulares de los géneros *Leishmania* y *Plasmodium*. Se inyectaron ratones normales (wt) y ratones gal-3^{-/-} de la cepa C57/BL con: a) promastigotes de *L. major* LV39; b) glóbulos rojos infectados (GRi) con *P. berghei* ANKA y c) GRi con *P. yoelii* 17XNL. La infección con *L. major*, se monitoreó a través de la medición del diámetro de la pata infectada. Las infecciones con *P. berghei* y *P. yoelii* se evaluaron a través de la determinación del porcentaje de GRi en extendidos de sangre periférica. Durante la infección con *P. yoelii* se observaron niveles de parasitemia significativamente meno-

res en ratones gal-3^{-/-} con respecto a ratones wt [(20,9 \pm 3,3) % vs. (38,9 \pm 4,6) %]. No se encontraron diferencias significativas frente a las infecciones con *L. major* y *P. berghei*. A los fines de investigar los mecanismos inmunológicos involucrados en la resistencia de ratones gal-3^{-/-} a *P. yoelii* se analizó la producción de citoquinas, proliferación de esplenocitos y la producción de anticuerpos específicos. Si bien no se observaron diferencias significativas en la proliferación y la producción de citoquinas, ratones gal-3^{-/-} presentaron mayores niveles de IgG contra el antígeno de superficie del merozoito MSP119, que ratones wt ($p < 0,05$). Un análisis más detallado reveló que esta diferencia se debe a un aumento en los niveles de IgG2b anti-MSP119 ($p < 0,05$). El presente estudio indica que Gal-3 bloquearía el desarrollo de una respuesta humoral efectiva con impacto mayor en aquellas patologías cuya resolución depende fundamentalmente de la producción de anticuerpos específicos.

455. (7693) INDUCCIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCIÓN PROSTÁTICA POR CHLAMYDIA MURIDARUM. MACKERN OBERTI, JUAN PABLO; MOTRICH, RUBÉN; PONCE, ANDRÉS; CUFFINI, CECILIA; MACCIONI, MARIANA; RIVERO, VIRGINIA

Depto de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. CIBICI-CONICET Instituto de Fisiología Humana. Instituto de Virología. Facultad Ciencias Médicas. UNC

Las infecciones por *Chlamydia trachomatis* han sido ampliamente estudiadas y descritas en modelos animales de tracto genital femenino. Por el contrario, no existen modelos de infección de tracto genital masculino a pesar de que ha sido postulada como agente causal de numerosos casos de prostatitis, uretritis y epididimitis. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo animal de infección prostática crónica que permita estudiar los mecanismos patogénicos y alteraciones subsecuentes. Para ello ratas Wistar fueron inoculadas con buffer SPG (Grupo C) o con 10(7) UFI de *Chlamydia muridarum* (Cm) (Grupo I) intraprostáticamente por métodos quirúrgicos. A los 15, 30 y 60 días post inoculación (pi) se sacrificaron y se extrajeron próstata, testículo y riñón. Extractos de ellos se cultivaron con una línea celular susceptible y se analizó por IF la presencia de Cm. Cultivos celulares infectados con extractos de próstata de 15, 30 y 60 días pi del grupo I mostraron la presencia de inclusiones Chlamydiales (IC), mientras que los infectados con extractos testiculares del grupo I mostraron IC sólo al día 60 pi. Cultivos con extractos prostáticos, testiculares y renales del grupo C no mostraron presencia de IC. Al realizar estudios histológicos de próstata, testículo y riñón sólo se observó lesión en próstata de animales del grupo I. La misma evidenció un infiltrado focalizado mononuclear y polimorfonuclear. Muestras seminales obtenidas por electroeyaculación del grupo I 25 días pi revelaron una disminución significativa en la concentración, movilidad, vitalidad e integridad de membrana de los espermatozoides con respecto a las muestras del grupo C ($p < 0.05$). Los niveles de ON en plasma seminal del grupo I se encontraron elevados con respecto al grupo C. De esta manera hemos demostrado que la inoculación intraprostática con Cm produce una infección que persiste 60 días, la que generaría un ambiente inflamatorio y alteraciones seminales que podrían comprometer la fertilidad.

456. (7808) MODULACIÓN DE LA BLASTOGÉNESIS DE CÉLULAS PERIFÉRICAS MONONUCLEARES (CPM) DE SUJETOS NORMALES POR LA PREINCUBACIÓN CON ESTEROIDES ADRENALES. D'ATTILIO, LUCIANO; BOZZA, VERÓNICA; MAHUAD, DANIEL; RONDELLI, FLAVIA; BOTTASSO, OSCAR; BAY, MARÍA LUISA

Instituto de Inmunología, Fac. de Cs. Médicas-UNR

Los glucocorticoides pueden suprimir la respuesta inflamatoria, la linfoproliferación y la síntesis de citocinas Th1. El andrógeno suprarrenal dehidroepiandrosterona (DHEA) parece desempeñar efectos opuestos. Estudios previos con CPM de

pacientes con tuberculosis (TB) y controles respondedores, estimuladas *in vitro* con M. tuberculosis sonicado (ST), más el agregado de Cortisol (Cort, 1 o 0.1 μ M) y/o DHEA (0.1, 0.01 o 0.001 μ M) mostraron que Cort inhibía la blastogénesis y la producción de interferón gamma, más manifiesto en TB. DHEA no ejerció efectos significativos. Dado que *in vivo* las células se hallan en un medioambiente con concentraciones predeterminadas de Cort y DHEA, en esta etapa investigamos si la presencia de estas hormonas, previa a la estimulación de las CPM, condicionaba la respuesta linfoproliferativa contra ST y Concanavalina A (ConA). Las CPM de sujetos sanos calmetizados (n=7) se preincubaron por 24 hs con las distintas dosis de Cort y/o DHEA (PRE), o únicamente con medio de cultivo (MC). A estas últimas -MC- se les agregaron los esteroides junto (JT) con los estímulos; los cuales se aplicaron a todos los cultivos: ST (10 μ g/ml) durante 5 días o ConA (5 μ g/ml) por 72 hs. Se cuantificó la incorporación de [(3)H]timidina (cpm x 1000, media \pm ee). ConA+Cort 1 μ M, en PRE (50.5 \pm 11.8) fue menor que ConA+Cort 1 μ M, JT (128.6 \pm 14, p<0.05, Wilcoxon), siendo ambas inferiores al control ConA (192.2 \pm 12.5, p<0.05). DHEA no revirtió el efecto del Cort; ej.: ConA+Cort 1 μ M+DHEA 0.1 μ M PRE: 49.0 \pm 9.4, JT: 124.0 \pm 14.6 (p<0.05), ni modificó la respuesta del mitógeno, ej.: ConA+DHEA 0.1 μ M PRE: 187.6 \pm 10.6, JT: 191.3 \pm 10.5. Cuando se estimuló con ST no se vieron diferencias significativas en relación a la preincubación con los esteroides. En concentraciones preexistentes elevadas de Cort (por ej. situaciones de estrés), el requerimiento de una respuesta linfoproliferativa sustancial se vería condicionada por este esteroide.

457. (7874) DEPRESIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y DE LAS RESPUESTAS TIMO-DEPENDIENTES EN RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA. OSTROWSKI, MATIAS (1); VERMEULEN, MÓNICA (2); GEFFNER, JORGE (2); ZABAL, OSVALDO; ZAMORANO, PATRICIA; SADIR, ANA; LÓPEZ, OSVALDO (3)

(1) Instituto de Virología. CICVyA. INTA; (2) Academia Nacional de Medicina; (3) North Michigan University

El Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) infecta ratones induciendo una inmunidad protectora duradera que se correlaciona con altos títulos de anticuerpos neutralizantes. Por el contrario, la inmunización de ratones con VFA inactivado por irradiación ultravioleta (UV-VFA) induce inmunidad protectora de corta duración. En el presente trabajo estudiamos las respuestas inducidas por infección con VFA en comparación con la vacunación con UV-VFA. La infección con VFA produjo depresión de la respuesta T-dependiente. En cambio, las células T de ratones vacunados con UV-VFA permanecieron funcionales. Las interacciones *in vitro* de VFA vivo o inactivado con las células dendríticas (CDs) fueron estudiadas. Las CDs fueron susceptibles a la infección con VFA aunque la producción de nuevos viriones infecciosos fue limitada. Como consecuencia de la infección de las CDs, se observó una disminución en la expresión de las moléculas de MHC clase II y de CD40, así como de la capacidad de estimular células T *in vitro*. La disminución de marcadores inmunomoduladores se correlacionó con cambios morfológicos de las DCs hacia un fenotipo macrófago. Estas modificaciones no fueron observadas cuando las CDs fueron pulsadas con UV-VFA. La transferencia adoptiva de DCs infectadas cargadas con VFA vivo o UV-VFA estimuló una respuesta secundaria de anticuerpos neutralizantes en ratones primados. La infección con VFA deprime las respuestas T-dependientes a través de su interacción con las CDs, y por lo tanto el inicio de la respuesta contra el mismo se produce en un contexto de falta de colaboración T. Por el contrario, la respuesta contra el virus inactivado se realiza a través de los mecanismos típicos de las respuestas Timo-dependientes.

458. (8033) LIPASA DE CANDIDA ALBICANS MODIFICA EN FORMA DIFERENCIAL LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO SOBRE MACRÓFAGOS. PARAJE, MG; RENNA, MS; CORREA, SG; SOTOMAYOR, CE

Inmunología. CIBICI. FCQ. UNC; CIBICI (CONICET). Inmunología, Fac. Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

En la interacción hongo, sus factores de virulencia y los Macrófago(Ma) el rol biológico de lipasas(LIP) de C.albicans, aún no ha sido establecido. Por ello una LIP extracelular producida por nuestra cepa de trabajo fue caracterizada y su efecto evaluado sobre diferentes poblaciones de Ma. El método de screening (Saboreaud/yema de huevo) detectó un halo de precipitación típico de estas enzimas, tanto para la faz leveduriforme e hifal del hongo. La actividad lipolítica se cuantificó (ac.oliva/Rodamina) utilizando como referencia lipasas de Rhizopus. LIP fue purificada con Sephadex G100. La proteína de 70 KDa, reveló una actividad lipasa de 75 U. Monocapas de Ma purificadas (1x10⁶ cel/well) provenientes de ratas Wistar normales(N), ratas infectadas(Ca)(día 3) o MaN incubados con C.albicans fueron cultivados en presencia de LIP (25 y 100 U) durante 24 y 48 hs y la producción de óxido nítrico(ON) fue evaluada (Griess). LIP fue capaz de gatillar la activación de la iNOS en MaN provocando un incremento significativo de ON dependiente de la concentración y tiempo de incubación (p<0.005). Mientras que la producción «ex vivo» de ON en MaCa estuvo incrementada, la menor dosis de LIP fue incapaz de modificar los niveles de este metabolito a las 24 y 48h. Por otra parte 100 U de LIP estimularon la actividad de iNOS provocando un aumento significativo de ON a ambos tiempos (p<0.05). La incubación simultánea del hongo y 100 U de LIP produjo una marcada disminución de este metabolito. La liberación de Lactato dehidrogenasa (LDH), marcadora de injuria celular fue evaluada y expresada como índice respecto al basal. Se observó una máxima actividad de LDH (In:5.6 y 6.2) cuando los MaN fueron cocultivados durante 24 y 48h en presencia del hongo y máxima concentración de LIP. C.albicans secretan una LIP de 70KDa capaz de inducir la producción de ON en células de la primera línea de defensas. El estatus de activación de la célula macrófaga y las condiciones particulares de la interacción condicionan el efecto biológico final.

459. (8058) AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE IL-5, IL-6 E INMUNOGLOBULINA A (IgA) EN PLACAS DE PEYER DE RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO (MMTV). VERCELLI, CLAUDIA; BURZYN, DALIA; MUNDIÑANO, JULIANA; LOMBARDI, GABRIELA; COSTA, HÉCTOR; NEPOMNASCHY, IRENE; PIAZZON, ISABEL

ILEX-CONICET, IHEMA, Academia Nacional de Medicina.

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 del 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 observamos que la activación de DCs *in vitro* por MMTV induce la secreción de IL-6, una de las citoquinas que promueve el switch de clase (SC) a IgA además de otras como IL-5 y TGF β . Se investigó en que momento ocurre el SC en la infección por MMTV utilizando un marcador molecular específico (transcripto circular-CT), que por RT-PCR se encontró a los 3 días de infección. Por citometría de flujo se analizó el % de IgA+/B220+ a diferentes días (d) de amamantamiento con madres a) infectadas o b) no. Los resultados fueron (media \pm SD, n=4): (a) 1.5 \pm 0.4 vs (b) 1.8 \pm 0.6 (2d); (a) 3.2 \pm 0.6 vs (b) 1.6 \pm 0.2 (3d); (a) 4.4 \pm 0.9 vs (b) 2 \pm 0.3 (5d); (a) 7 \pm 0.7 vs (b) 1.1 \pm 0.3 (7d) y (a) 10 \pm 0.7 vs (b) 1.7 \pm 0.3 (9d) (p<0.001). Se investigó la expresión de 3 citoquinas que participan del SC a IgA, la IL-6, la IL-5 y el TGF β . Se extrajeron ARNm de PPs de crías amamantadas como se mencionó anteriormente y se observó por RT-PCR un aumento de IL-5 e IL-6 a los 3 días de infección. Los niveles de TGF β permanecieron constantes. Estos resultados sugieren que el SC a IgA ocurre a partir del día 3 de infección y esto se correlaciona

con un aumento del % de células IgA+/B220+ en PPs de ratones infectados. Además, se observa un incremento en los niveles de IL-6 e IL-5 no así en los niveles de TGF β .

NEUROCIENCIAS 5: NEUROQUÍMICA Y NEUROFISIOLOGÍA 5 - CELULAR Y MOLECULAR 2

460. (6972) LA DISMINUCIÓN DE TRKB PRECEDE LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR STATUS EPILEPTICUS. UNSAIN, NICOLÁS; ANASTASÍA, AGUSTÍN; MASCÓ, DANIEL H.

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular. Cátedra de Biología Celular, FCEFYN. UNC

El Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) señala a través de dos tipos de receptores: TrkB y p75ntr. El Status Epilepticus (SE) en ratas induce muerte neuronal en hipocampo, entre otras regiones. Se especula que esta muerte es desencadenadora por la unión de BDNF con p75ntr, ya que aumentan post-SE (p-SE). Sin embargo, estudios *in vitro* demostraron que dicho fenómeno puede ocurrir sólo si las neuronas no están expresando TrkB. Por esto, nuestra hipótesis es que para que esta señalización pueda explicar la neurodegeneración observada p-SE, se debería observar una importante disminución de TrkB. Considerando esta hipótesis se determinaron por Western Blot los niveles de TrkB-FL (variante completa), BDNF y p53 (como indicador de apoptosis) en hipocampo de rata 0, 6, 12, 48 y 72 horas p-SE. Paralelamente se evaluaron por inmunohistoquímica cambios en la localización subcelular del receptor TrkB-FL en la misma área. En el grupo de animales que tuvieron SE se encontró una significativa disminución en TrkB-FL p-SE comparado con los que no recibieron este tratamiento (control = 100%, 12hs = 64+5%* y 72hs = 46+12%*). Así mismo, el ensayo de inmunohistoquímica mostró una completa pérdida de inmunoreactividad TrkB-FL en las dendritas del CA1-3 hipocampal. Además se observó un importante y significativo aumento en la expresión de BDNF (control = 100%, 48hs = 201+44%* y 72hs = 203+74%*) y de p53 (control = 100%, 48hs = 242+43%* y 72hs = 512+85%**). Interesantemente, el incremento de BDNF observado se produce al mismo tiempo que la disminución de su receptor TrkB, mientras que el cambio en p53 (aparición de muerte por apoptosis) es posterior a estas modificaciones (*= $p < 0.05$; **= $p < 0.001$). En conjunto, estos resultados sugieren que el BDNF podría inducir la muerte de esta población neuronal, ya que aumenta en un escenario donde también incrementa p75ntr y TrkB sufre una importante disminución. Este desbalance entre los dos tipos de receptores y su ligando podría tener un rol fundamental en el mecanismo de muerte observada después del SE.

461. (6993) EFECTO DE LA TRANSFERRINA SOBRE LA DEGENERACIÓN DE β III-TUBULINA LUEGO DE LA INYECCIÓN DE COLCHICINA EN EL NERVO CIÁTICO DE LA RATA. MUSOLINO, PATRICIA L.; CORONEL, M. FLORENCIA; SETTON-AVRUJ, C. PATRICIA (1); VILLAR, MARCELO J.

Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral; (1) Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, IQUIFIB-CONICET

El isotipo neuronal específico de la β -tubulina, β III-tubulina (β III-tub), es un importante componente de los neurotúbulos durante el crecimiento del axón y la regeneración del mismo luego de la injuria del nervio periférico. La expresión de β III-tub y su ARNm muestran un aumento considerable entre 1 y 4 semanas luego de la lesión del nervio periférico. En este trabajo hemos analizado la expresión de β III-tub y MBP en el nervio ciático y tibial luego de la inyección de colchicina y de colchicina más apotransferrina (aTf) simultáneamente en el nervio ciático. Los animales fueron anestesiados y sus nervios ciáticos expuestos e inyectados con 2 μ l de colchicina 2,5 mM. Un grupo de anima-

les fue además inyectado con una solución compuesta por 2 μ l de colchicina 2,5 mM y aTf 0,5 mg/ml aTf dentro del nervio ciático a mitad de su trayecto en el muslo. Las estructuras contralaterales fueron usadas como controles y también se hicieron animales sham. Luego de 1, 3, 5 y 7 días los animales fueron perfundidos y sus nervios ciáticos procesados con anticuerpos contra β III-tub y MBP. El resultado mostró un patrón normal de inmunoreactividad para ambas proteínas en los nervios contralaterales y en los animales sham. Se observó formación de acúmulos β III-tub y MBP inmunoreactivos (IR) característicos de la degeneración distales al sitio de inyección de la colchicina. La inyección simultánea de aTf y colchicina en el nervio ciático mostró una significativa disminución en el número de acúmulos β III-tub-IR a los 3 días postinjuria, seguido de una disminución en los acúmulos MBP-IR en los nervios tibiales (15 mm distales al sitio de inyección) a los 7 días de sobrevida. Estos resultados sugieren que la expresión normal de MBP en las células de Schwann podría depender de la integridad de los neurotúbulos en las fibras nerviosas demostrando la existencia de una interacción neurona-glia indispensable para el normal funcionamiento del nervio periférico.

462. (6999) LECTINA-HISTOQUÍMICA DE AZÚCARES EN HIPOCAMPO DE RATAS EXPUESTAS A AMBIENTE ENRIQUECIDO. BURGOS, V; HIDALGO, A; ARGIBAY, P

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

El efecto del ambiente enriquecido en roedores se manifiesta tanto a nivel comportamental, bioquímico y estructural en el hipocampo y otras regiones del cerebro. Estas modificaciones involucran participación de moléculas de adhesión y reconocimiento en células neuronales y gliales, siendo los glicoconjugados un grupo importante. Objetivo: Investigar a través de histoquímica con lectinas las potenciales modificaciones en la expresión de azúcares en hipocampo de ratas expuestas a condiciones de enriquecimiento ambiental. M y M: Ratas macho Wistar (P23) fueron asignadas al grupo de animales mantenidos en jaulas estándar o en ambiente enriquecido durante 15 días. Las condiciones de enriquecimiento ambiental consistieron en jaulas de metal (60x40x90cm) con varios elementos en su interior. Se usaron 5 lectinas específicas para diferentes azúcares: VVL(α/β N-Acetilgalactosamina), GNL(Manosa α -1,3 terminal), PNA(Galactosa β -1,3 N-Acetilgalactosamina), LTL(α -Fucosa) y AAL(Fucosa α -1,6 N-Acetilglucosamina, Fucosa α -1,3 N-Acetylactosamina). La distribución de cada marca se examinó con microscopio de fluorescencia. Resultados: El neuropilo de la capa piramidal de CA2 expresó α -Fuc (LTL), Gal β -1,3 GalNAc (PNA) y α/β GalNAc terminal (VVL) en el Control. En cambio, en el Enriquecido se observó marca débil para PNA y ausencia para las lectinas LTL y VVL. Las células piramidales de CA1 y CA2 expresaron marcación intensa para Man α -1,3terminal(GNL) en el Control, mientras que en el Enriquecido la marca fue más débil. Por otra parte, la capa polimórfica de CA4 y Giro Dentado fueron positivos para LTL y PNA(α -Fuc y Gal β -1,3 GalNAc, respectivamente) en el Control, y negativos en el Enriquecido. No se detectó positividad para Fuc α -1,6 GlcNAc o Fuc α -1,3 LacNAc (AAL) en hipocampos de ambos grupos. La exposición a un ambiente enriquecido genera desaparición o enmascaramiento en la expresión de azúcares normalmente expresados en hipocampo de ratas de condiciones estándar. Las consecuencias funcionales de este fenómeno y los mecanismos subyacentes deberán ser elucidados en futuras experiencias

463. (7011) NOVEDAD Y FAMILIARIDAD ESPACIAL. ¿DOS CARAS DE UNA MISMA MONEDA? MONCADA, DIEGO; VIOLA, HAYDÉE

Instituto de Biología Celular y Neurociencias, FMED, UBA

La exploración de un medio ambiente gatilla tanto el reconocimiento del contexto, como la extracción de sus características más particulares. La exploración de los animales decrece con el tiempo de exposición al contexto y se construye una memoria

de habituación espacial. Winograd y Viola (2004) demostraron que tras una breve exposición a un campo abierto (CA), los niveles hipocampales de pCREB (elemento de respuesta a AMPc, fosforilado) se encontraban aumentados, asociando dicho aumento a la detección de la novedad espacial. Así mismo, observaron una marcada disminución en los niveles de pCREB tras reiteradas exposiciones. En el presente trabajo estudiamos si el estado de fosforilación de este factor de transcripción funciona como un «switch» molecular de la noción de novedad o familiaridad espacial. Para evaluar una posible asociación entre la disminución de los niveles de pCREB con el reconocimiento de un contexto familiar entrenamos ratas en el modelo de exploración al CA con distintos protocolos, realizamos ensayos de western blot para medir los niveles de pCREB en la fracción nuclear hipocampal y evaluamos la persistencia de la memoria de habituación. Los resultados muestran una disminución en los niveles de pCREB una hora después de 30 minutos de exposición al CA, independientemente de que la exploración sea continua o repartida en 3 sesiones separadas por 3 o 24 hs ($p < 0.05$). Sin embargo, observamos que esta disminución no se asocia a la formación de una memoria de habituación más persistente ($p > 0.05$). Más aún, si los últimos 5 minutos de exploración ocurren en un contexto geoméricamente diferente el nivel de pCREB aumenta ($p < 0.05$), confirmando que responde ante una novedad y descartando la «fatiga del sistema bioquímico». En conjunto, nuestros resultados permiten proponer al estado de fosforilación de CREB como un marcador molecular hipocampal del reconocimiento espacial donde un aumento está asociado a la detección de la novedad y una disminución a la noción de familiaridad.

464. (7014) ESTRÉS CRÓNICO Y ANTIDEPRESIVOS: EFECTOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL HIPOCAMPO. FRICK, LUCIANA (1); ALFONSO, JULIETA (1); PALUMBO, MARÍA (2); SILBERMAN, DAFNE (2); GENARO, ANA (2); FRASCH, CARLOS (1)

(1) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas IIB-INTECH/UNSAM-CONICET; (2) CEFYBO-CONICET

La exposición prolongada a situaciones de estrés está involucrada en el desarrollo de desórdenes depresivos. El hipocampo es una estructura cerebral sensible al estrés. Dos modelos de estrés crónico han sido relacionados con la depresión: el estrés psicosocial en *Tupaia belangeri* y el estrés por inmovilización en roedores. En ambos modelos se observa una atrofia dendrítica de las neuronas de la región CA3 y una inhibición de la neurogénesis en el giro dentado, efectos que pueden ser revertidos por el tratamiento con antidepresivos. Recientemente, hemos identificado cuatro genes cuyos niveles de expresión disminuyen en el hipocampo de *T. belangeri* sometidos a estrés psicosocial: la neurotrofina NGF, la glicoproteína de membrana M6a, la proteína GNAQ y la quinasa CLK-1, disminución que es revertida por el tratamiento con clomipramina. El objetivo de este trabajo es estudiar los genes identificados en *T. belangeri*, en el modelo de estrés crónico por inmovilización en roedores. Para ello se analizaron sus niveles de expresión en el hipocampo, por RT-PCR en tiempo real. Se observó que los niveles de mRNA de NGF, M6a y GNAQ se redujeron un 40%, 38% y 32% ($p < 0.01$), mientras que los de CLK-1 permanecieron constantes. También se analizaron los niveles de expresión de otros genes, BDNF y CREB, que disminuyeron un 26% y 25% ($p < 0.01$). Por último, se analizó si el tratamiento con antidepresivos revierte los cambios producidos por el estrés. Se observó que la disminución de BDNF, NGF, GNAQ y CREB es revertida totalmente por el tratamiento con tianeptina, mientras que se vio una reversión parcial de la reducción de M6a. Los genes regulados diferencialmente podrían estar involucrados en las alteraciones observadas en el hipocampo, ya que han sido relacionados con procesos de neurogénesis, neuritogénesis y diferenciación neuronal. La reproducibilidad de los resultados encontrados en *T. belangeri* en otro modelo confirma la relevancia biológica de estos genes en la respuesta al estrés.

465. (7036) LAS HORMONAS ESTEROIDES EN LA DEGENERACIÓN RETINIANA INDUCIDA POR LA LUZ: PAPEL ANTAGÓNICO DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y LA PROGESTERONA. JULIÁN, LILIAN KARINA; LÓPEZ, ESTER MARÍA; COIRINI, HÉCTOR; LOPEZ-COSTA, JUAN JOSÉ

IBYME; Servicio Oftalmología, Htal Clínicas, Dpto Bioq. Humana FM-UBA; IBCyN "Prof. E. De Robertis"

La iluminación continua produce degeneración retiniana y modifica los niveles de glucocorticoides (GC) circulantes. Otros autores han demostrado que los GC tienen un efecto deletéreo sobre neuronas del hipocampo. Por ello, planteamos que el aumento de GC podría estar involucrado en la degeneración de la retina. Previamente mostramos que la adrenalectomía disminuye la degeneración retiniana inducida por la luz. En el presente trabajo evaluamos los efectos del tratamiento con altas dosis de corticosterona (CORT) y de progesterona (PROG) durante la iluminación continua evaluando sus efectos sobre la degeneración retiniana. 15 ratas Sprague Dawley fueron sometidas a iluminación continua (12.000 lux) por 7 días. Durante ese período, 5 animales fueron tratados diariamente con CORT (4 mg/kg; sc), otro grupo fue tratado con PROG (4mg/kg, sc ; n=5), y los restantes inyectados con vehículo (grupo control, CTL). Las ratas fueron anestesiadas y sacrificadas después del período de iluminación. Se extirparon los ojos y se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4%. Las secciones de crióstato se tiñeron con hematoxilina-eosina y el espesor de las retinas se determinó con un analizador de imágenes computarizado Kontron-Vidas. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el test de comparación múltiple de Student Newman-Keuls. Después de 7 días de iluminación, el espesor de la retina de las ratas tratadas con CORT fue significativamente menor que el observado en las ratas CTL ($62,29 \pm 7,32 \mu\text{m}$ vs $69,50 \pm 4,89 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). Por el contrario, el espesor de las retinas del grupo tratado con PROG fue significativamente mayor que el CTL ($77,30 \pm 8,08 \mu\text{m}$ vs $69,50 \pm 4,89 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). Los resultados presentes apoyan la hipótesis que los GC desempeñan un papel deletéreo adicional en el daño de la retina. Además, aportan evidencias sobre un efecto protector de la retina por la progesterona en el modelo de iluminación continua en la rata. (UBACYT-M020).

466. (7054) ESTUDIO ESTRUCTURAL Y ULTRAESTRUCTURAL DEL DAÑO RETINIANO INDUCIDO POR ASFIXIA PERINATAL. REY FUNES, MANUEL; LÓPEZ, ESTER MARÍA; CAPANI, FRANCISCO; HUARTE, MARÍA; LARREA, PABLO; LOPEZ-COSTA, JUAN JOSÉ; COIRINI, HÉCTOR; LOIDL, C. FABIÁN

IBCyN-Prof. E. De Robertis; IByME, Dept. Bioquímica Humana, F.Med-UBA, Univ. Católica de Cuyo, SJ

La asfisia perinatal (AP) produce un estado de isquemia global transitoria que puede provocar graves secuelas neurológicas entre las cuales se incluye la retinopatía proliferativa isquémica. Previamente en nuestro laboratorio hemos observado con técnicas convencionales (H-E y Nissl) que la AP produce cambios morfológicos en la retina. En el presente trabajo evaluamos en qué medida la AP induce reacción astrogliar usando un anticuerpo anti-GFAP (proteína gliofibrilar ácida) y neovascularización, empleando un anticuerpo anti-CD31 (marcador endotelial). Además mediante microscopía electrónica (ME) evaluamos cambios ultraestructurales. Los animales fueron sometidos a AP por inmersión transitoria de fetos en agua en condiciones de normotermia (AP) e hipotermia a 15°C (HIP) durante 20 minutos. A los 60 días de edad los animales fueron sacrificados, enucleados y procesados para inmunocitoquímica y ME. Con anticuerpo anti-GFAP observamos en el grupo AP un aumento en la inmunomarcación de la zona epirretinal a expensas de una hipertrofia de los procesos internos de las células de Müller y el engrosamiento de la capa limitante interna. Con anti-CD31, observamos un mayor grosor de la zona epirretinal reactiva con una marcada neoformación vascular. Mediante ME corroboramos las

alteraciones descritas por inmunocitoquímica. En el grupo HIP no se encontraron cambios significativos con respecto al grupo CTL. El engrosamiento epirretinal a expensas de la neoformación vascular e hipertrofia astrogial mülleriana es compatible con la descripción de membrana epirretinal que se desarrolla en humanos en condiciones de hipoxia-isquemia. Estos resultados demuestran que este modelo experimental es útil para estudiar los mecanismos patológicos involucrados en las retinopatías proliferativas isquémicas, tales como la retinopatía del prematuro. La hipotermia promete ser una herramienta terapéutica eficaz para reducir el daño ocular. (UBACYT - M020).

467. (7147) ACTIVIDAD DEL CICLO GLUTAMATO/ GLUTAMINA EN RETINAS DE RATAS CON HIPERTENSION OCULAR. MORENO, MARÍA CECILIA; DE ZAVALIA, NURIA; SALIDO, EZEQUIEL ; KELLER SARMIENTO, MARÍA INÉS; ROSENSTEIN, RUTH

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, UBA

El glutamato es el principal neurotransmisor retiniano, aunque en concentraciones suprafisiológicas resulta tóxico a nivel local. De hecho, se ha señalado al aumento en los niveles de glutamato como factor causal en ciertas patologías retinianas. En las células de Müller, las principales responsables de la recaptación del aminoácido, el glutamato es convertido a glutamina en una reacción catalizada por la glutamina sintetasa. La glutamina transportada a neuronas es reconvertida en glutamato (catalizada por la glutaminasa), lo que completa el ciclo glutamato/glutamina. El objetivo de este trabajo fue examinar la actividad de este ciclo en retinas de ratas con 3 semanas de hipertensión ocular inducida por la administración de 25 µl de una solución de 10 mg/ml de ácido hialurónico (AH) en la cámara anterior de un ojo de cada animal. Los ojos contralaterales se inyectaron con el mismo volumen de vehículo. En estos animales se analizó el influjo y la liberación de glutamato (con 3H-glutamato) y de glutamina (con 3H-glutamina), la actividad de glutamina sintetasa (por espectrofotometría), y de glutaminasa (con 3H-glutamina). El tratamiento con AH disminuyó significativamente el influjo de glutamato (15% de disminución, $p < 0.01$) y la actividad de glutamina sintetasa (25% de disminución, $p < 0.01$) y aumentó el transporte de glutamina (23% de aumento, $p < 0.01$) y la actividad de glutaminasa (38% de aumento, $p < 0.01$). La liberación de glutamato y glutamina tanto en condiciones basales como en presencia de un estímulo despolarizante de alto K⁺ (50 mM) no cambió significativamente entre los ojos inyectados con vehículo o con AH. Dado que un clearance adecuado de glutamato es imprescindible para una función normal de la sinapsis excitatoria y prevención de excitotoxicidad, el aumento en los niveles sinápticos de este neurotransmisor y las alteraciones en el ciclo que regula su síntesis y reciclado podrían constituir factores causales tempranos en la retinopatía glaucomatosa.

468. (7148) EFECTO IN VITRO DEL ÁCIDO 3-HIDROXILUTÁRICO SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN CEREBRO DE RATAS. LATINI, ALEXANDRA; BORBA ROSA, RAFAEL; SCUSSIATO, KARINA; LEIPNITZ, GUILHIAN; FERREIRA, GUSTAVO C.; FUNCHAL, CLÁUDIA; JACQUES-SILVA, MARIA CAROLINE; BUZIN, LUCIANE; CASSINA, ADRIANA; RODRÍGUEZ, MARIA

Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

El ácido 3-hidroxilutárico (3HGA) se acumula en los tejidos y fluidos biológicos de los pacientes afectados por la deficiencia en glutaril-CoA deshidrogenasa (DGD). DGD es una neurometabolopatía caracterizada por severas alteraciones neurológicas cuya fisiopatología aún no está definida. En este trabajo, fue investiga-

do el efecto in vitro del 3HGA (0,01 – 5 mM) sobre las actividades de los complejos de la cadena respiratoria; de la creatina kinasa (CK) total, mitocondrial y citosólica y de la Na⁺-K⁺-ATPasa en corteza cerebral de ratas. Las actividades del complejo II y de la succinato deshidrogenasa fueron medidos también en células de glioma transformadas (C[6]). El efecto del 3HGA sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias de cerebro de ratas fue posteriormente estudiado. Finalmente, se investigó el efecto del 3HGA sobre la morfología y viabilidad de las células C[6]. Se evidenció que el 3HGA inhibió significativamente la actividad del complejo II de la cadena respiratoria y de la succinato deshidrogenasa sin alterar las actividades de los otros complejos. Las actividades de la Na⁺-K⁺-ATPasa y de las CKs no fueron modificadas por el metabolito. 3HGA significativamente disminuyó el control respiratorio (estado III / estado IV) tanto con sustratos ligados a la producción de NADH (glutamato/malato) como de FADH₂ (succinato). Finalmente, el tratamiento de las células C[6] por 6 horas con 3HGA provocó una alteración en la morfología sin afectar la viabilidad celular y sin inducir apoptosis. Estos resultados indican que el 3HGA provoca un déficit energético cerebral moderado y que disminuye el grado de acople mitocondrial lo cual podría ser responsable del daño cerebral característico de los afectados por DGD.

469. (7149) EL TRATAMIENTO CON EL ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA (FXT) REVIERTE LA REDUCCIÓN DE LA NEUROGÉNESIS EN EL GIRO DENTADO DE RATONES DIABÉTICOS POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ). BEAUQUIS, JUAN; SARAVIA, FLAVIA; ROIG, PAULINA; HOMO-DE LARCHE, FRANCOISE; DE NICOLA, ALEJANDRO

IBYME, Dpto de Bioquímica Humana, Fac de Medicina, UBA y CNRS 7059, Université Paris 7, Francia

En trabajos anteriores observamos que la capacidad neurogénica –la proliferación de nuevas neuronas– del hipocampo estaba muy afectada en ratones con diabetes tipo I (T1D) por administración de STZ. Esta alteración se inscribe dentro de otras descriptas que afectan distintas estructuras cerebrales y en especial el hipocampo ligadas a la diabetes. Numerosos estudios muestran que la prevalencia de la depresión es muy alta en T1D y por otro lado, la reducción de la neurogénesis es característica de ciertas depresiones. Objetivo: Explorar si el tratamiento con FXT era capaz de aumentar la proliferación celular y modular la diferenciación y migración de nuevas neuronas granulares en la T1D. Se trataron con STZ (190 mg/kg, ip) ratones machos C57Bl/6 adultos y a los 10 días se administró diariamente FXT (10mg/kg) o vehículo por 10 días. Durante los 7 días previos o solo 2 hs antes del sacrificio recibieron bromodesoxiuridina (BrdU, 80 mg/kg, ip). El estudio de proliferación mostró un aumento significativo del número de células BrdU⁺ en los diabéticos tratados con FXT (control, $ct\ 231.3 \pm 50.3$ - en 750 um de giro dentado; $ctFXT\ 173.8 \pm 19$; diabéticos, $db\ 114.2 \pm 13\ p < 0.05\ vs\ ct$; $dbFXT\ 220 \pm 13.2\ p < 0.001\ vs\ db$). En cuanto a diferenciación y migración celular, el grupo diabético que recibió BrdU durante 7 días exhibió también una disminución significativa del número de células positivas y el diabético tratado con FXT mostró una fuerte tendencia al aumento. En estos grupos se estudió el fenotipo de las células BrdU⁺ mediante co-localización con marcadores gliales (20% de GFAP⁺) y neuronales (Neu-N, Tuj-1, nestin) utilizando microscopía confocal. Este estudio reveló que la neurogénesis afectada en la T1D puede revertirse con el tratamiento antidepresivo y que el mismo no modifica el fenotipo neuronal –75% de acuerdo a la colocalización– de las células proliferantes que se integrarán al circuito hipocampal.

470. (7206) STRESS EXTERNO Y MAPK'S EN EL SNC: JNK, P38 Y ERK EN UN MODELO DE HIPOXIA AGUDA PRE-NATAL. VACOTTO¹, MARINA; POZO DEVOTO¹, VICTORIO; COSO², OMAR; FISZER DE PLAZAS¹, SARA

1- Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Prof. Dr. E. De Robertis, Fac. de Medicina; 2- Laboratorio de Fi-

siología y Biología Molecular, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

JNK y p38 pueden desencadenar muerte celular por apoptosis cuando son activadas en respuesta a un estímulo de stress externo, mientras que ERK durante la embriogénesis es activada en respuesta a factores de crecimiento y mitogénicos produciendo división y proliferación celular. Resultados previos de nuestro laboratorio revelaron que la hipoxia aguda prenatal (HAP) produjo un aumento significativo en el número de células apoptóticas en los embriones hipóxicos vs. controles. El objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar las posibles alteraciones producidas en las diferentes MAPK'S por una HAP (8% de [O₂], 60 min.), en el SNC en desarrollo. A tal fin, se determinó la cinética temporal de la expresión de los niveles de JNK, p38 y ERK (en sus formas fosforilada y no fosforilada), a partir de fracciones citosólicas de lóbulo óptico de pollo, del día embrionario (DE) 12, mediante la técnica de Western Blot. Los resultados obtenidos mostraron que a los 0 min. post-hipoxia (P-H) se produjo un aumento significativo de los niveles de JNK y P-JNK ($P < 0,01$ y $P < 0,05$, respectivamente), mientras que los niveles máximos de P-JNK se alcanzaron a los 10 y 30 min. A estos tiempos la relación P-JNK/JNK fue de $1,912 \pm 0,341$ y $1,920 \pm 0,304$, respectivamente ($n=5$, $P < 0,01$). Por otro lado, los niveles de p38 se incrementaron a los 10 min. P-H ($p < 0,05$), mientras que P-p38 aumentó a los 0 min. P-H ($P < 0,01$), tiempo en el cual la relación P-p38/p38 fue de $1,657 \pm 0,203$ ($n=5$, $P < 0,01$). Por último, la expresión de ERK, fue máxima a los 0 min. P-H ($P < 0,01$) no modificándose los valores de P-ERK hasta 2 horas P-H ($P < 0,05$), siendo en todos los casos la relación P-ERK/ERK no significativa ($n=5$). En conclusión, los resultados a nivel molecular sugieren que la HAP produce en el DE 12 un aumento de los niveles activos de las MAPK'S sensibles a stress externo JNK y p38, no viéndose modificada la expresión de ERK. Además, la activación de JNK y p38 precede temporalmente al proceso de muerte celular programada inducida por la hipoxia.

471. (7821) EFECTOS SOBRE LA MIELINIZACIÓN DEBIDOS A LA DISMINUCIÓN EN LA ACTIVIDAD DEL PROTEASOMA. MILLET, VIOLETA; BESIO MORENO, MARCOS; SOTO, EDUARDO; PASQUINI, JUANA; PASQUINI, LAURA

Depto de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica; UBA, CONICET; Buenos Aires

Nuestro laboratorio ha demostrado que la disminución de la actividad del proteasoma en cultivos primarios de oligodendrocitos (OLGc) produce aumento en su viabilidad, retiro del ciclo celular y su diferenciación precoz (Pasquini y col., 2003). Además nuestros resultados recientes demuestran que la disminución en la actividad del proteasoma lleva a la activación del promotor de MBP en una línea oligodendroglial N20.1 a través de la estabilización de Sp1 y p27 (Calatayud y col, en preparación). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos decidimos evaluar in vivo las consecuencias sobre la mielinización debidas a una disminución en la actividad del proteasoma. Para ello se inyectaron intracranalmente ratones machos Swiss al día postnatal 7 con distintas dosis de lactacistina, esta inyección fue repetida a las 48 hs. Al día 17 los animales fueron anestesiados y perfundidos, se diseccionaron los cerebros y se trataron convenientemente para determinaciones inmunohistoquímicas o parámetros bioquímicos de mielinización y determinación de las actividades del proteasoma. Nuestros resultados muestran una buena correlación entre la dosis de lactacistina utilizada y la inhibición en las actividades del proteasoma. Además obtuvimos un aumento los niveles de expresión de las diferentes isoformas de MBP evaluadas por Western Blot y aumento significativo ($p < 0,001$) de los galactolípidos o cerebrosidos característicos de la mielina. Estos estudios serán confirmados por la evaluación de otros parámetros bioquímicos e inmunohistoquímicos de mielinización. Estos resultados demuestran una analogía en los efectos sobre la diferenciación oligodendroglial por la disminución en la actividad del proteasoma in vitro e in vivo lo cual resultada de gran

significancia para el estudio y tratamiento de diversas patologías desmielinizantes como la Esclerosis Múltiple.

472. (8026) EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE ARN ANTISENSE PARA NMDAR1 EN HIPOCAMPO DE RATA DESDE UN VECTOR HSV-1. ADROVER, M(1); MUÑOZ, M(2); CHELI, V(2); REVOL-GUYOT, V(3); BLANCO, C(4); KORNBLIHTT, A(2); EPSTEIN, A(3); JERUSALINSKY, D(1)

Instituto de Biología Celular & Neurociencias Prof «E. De Robertis», Fac. de Medicina, UBA 1BC&N, Fac Med, 2LFBM, FCEN, 4Dpto Anat, Fac Vet, UBA; 3Ctr Gen Cel & Mol, Univ C Bernard, Francia

Para estudiar la participación del receptor NMDA en aprendizaje y memoria se construyeron vectores virales amplicon (A) derivados de HSV-1 portadores de secuencias sense (+) o antisense (-) de la subunidad NR1 y del gen de la green fluorescent protein (GFP). Los vectores se utilizaron para modificar la expresión de NR1. Por infección A-GFP/NR1(+) y A-GFP/NR1(-) se observó la expresión de los transgenes en cultivos celulares por epifluorescencia e inmunofluorescencia; por westernblot (WB) se evidenció aumento de NR1 con el transgén sense, y disminución con el antisense, y por RT-PCR se observó un fragmento de amplificación correspondiente a cada transgén. Los vectores fueron inyectados in vivo en hipocampo de rata. A-GFP/NR1(-) interfirió con el aprendizaje y la memoria, mientras que con A-GFP/NR1(+) no hubo diferencias con los controles inyectados con A-GFP o con vehículo. Esto sugirió que el antisense expresado desde A-GFP/NR1(-) sería responsable del deterioro comportamental, por lo que nos propusimos corroborar su expresión en el cerebro. Esta se evidenció por epifluorescencia e ICQ. Sin embargo, por WB y por RT-PCR los resultados no fueron concluyentes. Por WB se observó escasa disminución de NR1 en los animales infectados con A-GFP/NR1(-) por limitaciones técnicas, mientras que por RT-PCR se comprobó la presencia de un «supuesto antisense» en animales infectados con A-GFP/NR1(+), A-GFP/NR1(-), A-GFP, o sin tratamiento, lo que sugirió la presencia de un «antisense endógeno». Para investigar su posible existencia se realizaron RT-PCRs con distintos pares de oligonucleótidos, secuenciando los productos de amplificación, y también utilizando PCR en tiempo real. Los resultados permiten concluir que el «ARN antisense» encontrado se debería a un artefacto de técnica de RT-PCR, constituyendo un fenómeno común para ARNm, y que las alteraciones comportamentales observadas en los animales inyectados se deberían al antisense expresado desde el transgén.

NEUROCIENCIAS 6: NEUROQUÍMICA Y NEUROFISIOLOGÍA 6 / CELULAR Y MOLECULAR 3

473. (6811) MECANISMOS ENDOCITÓTICOS Y SU RELACIÓN CON EL CICLADO VESICULAR EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN. PÉREZ BAY, ANDRÉS EZEQUIEL; IBAÑEZ, LORENA I.; UCHITEL, OSVALDO D.; MARENGO, FERNANDO D.

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular - IFIByNE - Fac. de Ciencias Exact. y Nat. - UBA

Los mecanismos endocíticos que recuperan la membrana y las vesículas liberables luego de una exocitosis masiva no están bien definidos en células cromafines. En este trabajo, por medio del uso del fluoróforo FM 1-43, se determinó que células cromafines sometidas a exocitosis masiva (> 70% de la membrana plasmática) provocada por una despolarización por 3' con potasio 50 mM (calcio 2mM) son capaces de recuperar por endocitosis una cantidad equivalente de membrana. Sin embargo, una segunda despolarización bajo las mismas condiciones de potasio y calcio, solamente exocita el 32±7% del fluoróforo internalizado, reteniéndose el resto en grandes corpúsculos lo-

calizados y delimitados. La baja liberación de fluoróforo previamente internalizado no se debió a exocitosis basal entre ambas estimulaciones, ya que la ausencia de calcio en ese período no aumentó esa fracción. Para reducir la cantidad de membrana reciclada, se bajó la concentración de calcio durante el estímulo a 0,5 mM. En estas condiciones las células fueron capaces de reciclar la totalidad de la membrana excitada en nuevas vesículas liberables (24 ± 4 vs $21 \pm 3\%$, $n=14$), lo que se acompañó de una marcada disminución de corpúsculos fluorescentes al final del experimento. Experimentos en los que se reemplazó calcio por bario confirman estos resultados. En resultados preliminares se observó que la estimulación en presencia de dextranos fluorescentes (40000 KD) permite marcar (con baja eficiencia) corpúsculos celulares. Estos resultados sugieren la existencia en células cromafines de un proceso endocítico que se activaría en condiciones de alta exigencia a fin de mantener la homeostasis de la membrana plasmática, pero a la vez incapaz de recuperar el «pool» liberable de vesículas en el marco temporal de nuestros experimentos. Un proceso de «bulk» endocitosis, con la consecuente formación de vacuolas y/o cisternas sería un mecanismo posible.

474. (6978) MODIFICACIONES DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE B-FGF Y GDNF COMO POSIBLE MECANISMO DE NEUROPROTECCIÓN INDUCIDO POR ELECTROSHOCK. ANASTASÍA, AGUSTÍN; DE ERAUSQUIN, GABRIEL; MASCÓ, DANIEL H

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular- Cátedra de Biología Celular- F.C.E.F. y N. U.N.C.

Experimentos de nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento crónico con electroshock de baja intensidad (LECS) es capaz de tener un extraordinario efecto neuroprotector en un modelo de Enfermedad de Parkinson. Al mismo tiempo se conoce, mediante extensa bibliografía, que la administración exógena de Factor Trófico Derivado de la Glia (GDNF) o del Factor Básico derivado de Fibroblastos (b-FGF) induce neuroprotección en el mismo modelo. Por lo tanto es posible que el efecto neuroprotector de LECS sea debido a cambios en la expresión endógena de al menos alguno de estos dos Factores Tróficos (FTs). Ratas normales y lesionadas unilateralmente con 6-OHDA (administrada intracerebralmente en el Medial Forebrain Bundle) fueron tratadas crónicamente, antes y después de la lesión, con una sesión diaria de LECS. Se analizaron por medio de SDS-PAGE y Western Blott los niveles de GDNF y b-FGF en la Substantia Nigra y Estriado (áreas involucradas en modelo de Parkinson). Para evaluar la efectividad de la lesión y el efecto neuroprotector de LECS se utilizó análisis inmunohistoquímico y conductual. El tratamiento con LECS en animales normales incrementa los niveles de expresión de GDNF y b-FGF en la Substantia Nigra (SN) y sólo de b-FGF en el Estriado. En animales lesionados con 6-OHDA, los niveles de GDNF disminuyen en la SN ipsilateral a la lesión y el tratamiento con LECS restaura el GDNF a niveles similares al control. Por otro lado, los niveles de b-FGF en animales lesionados no cambian en la SN ipsilateral, sin embargo el tratamiento con LECS induce un marcado incremento en este área. La restitución de los niveles de GDNF y el incremento de b-FGF en la substantia nigra ipsilateral a la lesión con 6-OHDA sugieren que estos FTs podrían participar en el mecanismo neuroprotector que induce el tratamiento con LECS. Este trabajo indica, por primera vez, la posibilidad que modificaciones de niveles de FTs endógenos pueden tener efecto neuroprotector en enfermedades neurodegenerativas.

475. (7151) EFECTO DE LOS ÁCIDOS D-2-HIDROXIGLUTÁRICO Y L-2-HIDROXIGLUTÁRICO SOBRE PARÁMETROS ENERGÉTICOS EN CEREBRO DE RATAS. SCUSSIATO, KARINA; LATINI, ALEXANDRA; GONÇALVES DA SILVA, CLEIDE; RODRÍGUEZ, MARIANELA; CASSINA, ADRIANA; RIBEIRO, CÉSAR A. J.; SCHUCK, PATRÍCIA F.; LEIPNITZ, GUILHIAN; RADÍ, RAFAEL; WAJNER, MOACI

Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Los ácidos D-2-hidroxisglutárico (DGA) y L-2-hidroxisglutárico (LGA) se acumulan en los tejidos y fluidos biológicos de los pacientes afectados por las acidurias orgánicas D-2-hidroxisglutárico (DHGA) y L-2-hidroxisglutárico (LHGA), respectivamente. DHGA y LHGA se caracterizan clínicamente por severas alteraciones neurológicas cuya fisiopatología aún es desconocida. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo, fue investigar el efecto in vitro de DGA y LGA sobre parámetros respiratorios mitocondriales como la respiración en estado IV y III y el índice del control respiratorio (RCR), como así también sobre la actividad de creatina kinasa mitocondrial (Mi-CK) en encéfalo de ratas. Utilizando sustratos energéticos ligados a la producción de NADH (glutamato/malato) y FADH₂ (succinato), se observó que DGA y LGA disminuyeron significativamente el RCR. Fue observado también que el DGA redujo el estado IV de respiración medido a nivel del complejo IV de la cadena respiratoria. Por otro lado, la actividad de la Mi-CK fue inhibida por DGA y LGA en corteza cerebral y en cerebelo de ratas, respectivamente. Estos hallazgos sugieren que DGA y LGA disminuyen el grado de acople mitocondrial y que el DGA reduce la actividad del complejo IV. Por otra parte, la inhibición observada en la actividad de la Mi-CK provocaría una alteración en el tamponamiento energético o en el transporte de grupos fosfatos de alta energía. Por lo tanto, podría especularse que el déficit energético estaría involucrado en la fisiopatología de las alteraciones del SNC característico de los afectados de DHGA y LHGA. Apoyo Financiero: CNPq/PIBIC, PROPESQ/UFRGS, FAPERGS.

476. (7176) LA ENDOTELINA 1 Y 3 DISMINUYEN LA ACTIVIDAD DE LA TIROSINA HIDROXILASA A CORTO PLAZO A TRAVÉS DE LA VÍA DEL ÓXIDO NÍTRICO TANTO EN EL HIPOTÁLAMO ANTERIOR COMO EN EL POSTERIOR. CAROLINA, MORGAZO; DI NUNZIO, ANDREA; HOPE, SANDRA; BIANCIOTTI, LILIANA (1); VATTA, MARCELO

Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA (1) Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA

La disponibilidad intracelular y la liberación de catecolaminas, y la activación de quinasas modulan la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH). Trabajos previos mostraron que la endotelina 1 y 3 (ET1 y ET3) modulan la liberación neuronal de noradrenalina y la actividad de la TH en hipotálamo anterior y posterior (HA y HP). Las ETs disminuyen la actividad de TH en HA y HP. Estos efectos son mediados por el receptor ETB en el HA y un receptor atípico en HP. El objetivo del presente trabajo fue investigar la implicancia de la vía del óxido nítrico (ON) en estos efectos. Los experimentos se realizaron en HA y HP de ratas Sprague-Dawley macho (250-300 g) incubados durante 30 min con ET1 o ET3 y/o diferentes inhibidores. La actividad de TH se determinó por el método radioenzimático de Park y col. (Brain Res., 508,301,1990). Los resultados se expresan como % \pm ES (ANOVA y t test mod. Bonferroni; * $p < 0.05$; n: 5-8). Cuando se inhibió la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) con L-NAME 10 μ M se observó la inhibición de la disminución producida por ET1 y ET3 (HA: 103.9 ± 6.9 vs 117.7 ± 11.8 y 98.8 ± 4.3 ; HP: 106.5 ± 9.6 vs 100.8 ± 3.6 y 106.6 ± 8.8). En presencia del inhibidor de la isoforma neuronal, 7NI 10 μ M los efectos de las ETs también se bloquearon (HA: 101.1 ± 4.6 vs 105.4 ± 6.6 y 101.2 ± 5.2 ; HP: 108.4 ± 5.7 vs 100.4 ± 5.6 y 112.4 ± 6.2). Como el ON activa la vía del GMPc, se estudió los efectos de las ETs en presencia de los inhibidores de la guanilato ciclasa soluble (ODQ) y PKG (KT5823). Los resultados muestran que en ambos casos la disminución de la actividad de la TH producida por ambas ETs en el HA y HP, fueron inhibidas tanto por el ODQ como por el KT5823. Estos resultados nos permiten concluir que en el HA y HP, la ET1 y ET3 disminuyen la actividad de TH a través de una vía que implica al ON-GMPc-PKG.

477. (7219) DELINEAMIENTO DEL SITIO DE UNIÓN PARA CONOTOXINAS DEL RECEPTOR NICOTÍNICO A ACETILCOLINA. CORTEZ, LEONARDO; HELLMAN, ULF (1); BISCOGLIO, MIRTHA

Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (UBA-CONICET). Buenos Aires, Argentina (1) Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden

El receptor nicotínico a acetilcolina (nAChR) es una proteína pentamérica formada por cuatro subunidades: dos alfa, una beta, una gama y una delta. El ligando natural se une a sitios ubicados en las interfases alfa/gama y alfa/delta. Las alfa-conotoxinas, péptidos de entre 12 y 19 aminoácidos, pueden unirse con diferente afinidad a dichos sitios y permiten diferenciar nAChRs provenientes de distintos géneros. Es más, demostramos en nuestro laboratorio que la Conotoxina MI puede distinguir receptores de distintas especies del mismo género. Se utilizó un aducto resultante de la derivatización de la conotoxina radioiodinada con un reactivo de fotoafinidad que posibilitó la unión covalente entre la toxina y el receptor. Así se demostró que la Conotoxina MI puede diferenciar los receptores provenientes de Torpedo marmorata y Torpedo californica (SAIB 2001). En este trabajo se abordó la identificación de los fragmentos del receptor unidos al aducto con el fin de investigar los aspectos estructurales que justifican la diferente afinidad de la conotoxina derivatizada a los dos sitios de unión de ligandos del receptor de T. marmorata. Para ello el complejo toxina-receptor se sometió a SDS-PAGE y las subunidades marcadas - alfa y delta - se identificaron por autorradiografía y se digirieron con endopeptidasa V8 en la trama de un segundo gel; los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de PVDF. La correspondiente autorradiografía permitió reconocer los péptidos marcados cuya secuencia N-terminal se determinó. Cada fragmento se sometió luego a digestión trípica y espectrometría de masa lo que permitió circunscribir aun más el sitio de unión. Un reactivo de afinidad permitió identificar fragmentos cortos del receptor nicotínico a acetilcolina involucrados en el sitio de unión de la Conotoxina MI. El delineamiento de dicho sitio de unión permitirá conocer las características estructurales que justifican la diferente afinidad de la conotoxina a los sitios de unión de ligandos.

478. (7261) MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL NÚCLEO RETICULAR Y NÚCLEOS MOTORES DEL TÁLAMO POR ACTIVACIÓN DEL GLOBO PÁLIDO EXTERNO. ABADÍA, BERNARDETTE; RUIZ, GUILLERMINA; PAZO, JORGE H.

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

Los ganglios de la base controlan la actividad cortical motora a través del tálamo, mediante las vías directa e indirecta. La primera es una salida directa del estriado al globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra reticulada (SNr) y la segunda involucra al globo pálido externo (GPe). En años recientes se ha postulado una tercera vía hacia el tálamo a través del globo pálido externo (GPe). Esta es una vía anatómica directa que lo conecta al núcleo reticular del tálamo (NRT). La actividad de este núcleo es clave en la fisiología de las relaciones tálamo-cortical ya que es el único núcleo talámico inhibitorio. Sin embargo la función de estas relaciones no han sido estudiadas y de ahí nuestro interés en analizarlas, desde un punto de vista electrofisiológico y tratar de establecer su influencia sobre el tálamo motor. Los experimentos se realizaron en ratas anestesiadas con uretano, en las que se registró la actividad unitaria neuronal del NRT y de los núcleos motores de la rata el ventromedial (VM) y el ventrolateral (VL) con microelectrodos y se estimuló el GPe con microinyecciones de bicuculina (25 ng/0.3 ml). La activación del GPe produce inhibición de las neuronas del NRT ($p < 0.008$, Holm-Sidak, ANOVA de una vía) con una latencia de 12.1 ± 0.68 min. y duración de $38,43 \pm 11.3$ min. ($n = 11$). Sobre las neuronas del VM-VL su acción es excitatoria en 6 de las 8 neuronas analizadas ($p < 0.05$, Dunn test, Kruskal-Wallis ANOVA de una vía). En las 2 reatantes el efecto fue inhibitorio. Con estos resultados

preliminares podemos concluir que el GPe tiene una acción inhibitoria sobre la neuronas del NRT, lo que puede poner en marcha un mecanismo de desinhibición sobre los núcleos motores que se reflejaría en excitación.

479. (7278) PAPEL DE LA ENDOTELINA Y SUS RECEPTORES EN LA DEGENERACION FOTOTOXICA DE LA RETINA. TORBIDONI, ANA VANESA; IRIBARNE, MARÍA; SUBURO, ANGELA MARÍA

Facultad De Ciencias Biomedicas-Universidad Austral

La endotelina-1 (ET-1) es un potente vasoconstrictor que además tiene acciones tróficas sobre los astrocitos y antiapoptóticas sobre otros tipos celulares. Demostramos previamente la presencia de ET-1 y su receptor ET-B en los astrocitos de la retina. También demostramos que éstos se hipertrofian y aumentan la expresión de ET-1 y ET-B durante la degeneración de fotorreceptores inducida por luz. Para evaluar las funciones de ET-1 y sus receptores en la degeneración fototóxica, estudiamos su distribución en la retina externa de animales normales o iluminados. Utilizamos ratones BALB-c, que fueron mantenidos con luz cíclica (60 lux) o constante (1.500 lux) desde 4 a 18 días. Estudiamos la distribución de ET-1 y sus receptores en cortes de criostato. Además, se prepararon retinas enteras para evaluar la densidad de núcleos con caspasa-3 clivada (CC-3), un marcador de apoptosis, y la cantidad de inmunoreactividad para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), una medida de gliosis. Ensayamos también el efecto de tezosentan (10 mg/kg), un antagonista de los receptores ET-A y ET-B, sobre la muerte de los fotorreceptores y la hipertrofia astrocitaria. En el epitelio pigmentario (EP) se detectó ET-1 y ET-A, pero sólo ET-1 aumentó en los ratones iluminados. También encontramos moléculas endotelinérgicas en la capa plexiforme externa (CPE). ET-1 y ET-A co-localizaban en estructuras que correspondían a fotorreceptores y/o células bipolares, mientras que ET-B aparecía en las células horizontales. Las estructuras endotelinérgicas de la CPE desaparecieron después de la iluminación prolongada. En animales iluminados durante 4 días, tezosentan produjo una reducción tanto en el número de núcleos con CC-3 como en la inmunoreactividad para GFAP de la capa astrocitaria. Postulamos que las moléculas endotelinérgicas de la OPL podrían modular la respuesta de los fotorreceptores a la injuria lumínica. La disminución de la gliosis también apoyaría un efecto protector del bloqueo de los receptores endotelinérgicos.

480. (7290) EXPRESION DIFERENCIAL DE VEGF Y FGF-10 EN DISTINTAS REGIONES DEL CEREBRO DE RATA. ADRIS, SORAYA (1); MERRY, TONY (2); ARGIBAY, PABLO (1)

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires (1) ICBME, Hospital Italiano de Bs As (2) Dep. of Biochemistry, Oxford University, Inglaterra

Antecedentes: La función de VEGF ha sido asociada principalmente con la angiogénesis. Sin embargo, en los últimos años se la ha localizado en neuronas y células gliales, vinculándose su función con diversos procesos relacionados con la neuroprotección, plasticidad sináptica y neurogénesis. Por otra parte, FGF-10, el cual había sido descrito inicialmente como un factor angiogénico y de reparación de tejidos, recientemente también ha sido implicado en procesos relacionados con la neurogénesis. Objetivo: Estudiar la expresión diferencial del ARNm de las dos principales isoformas de VEGF (VEGF120 y VEGF164) y FGF-10 en distintas regiones del cerebro de rata. Material y Método: La expresión de dichos genes fue analizada mediante PCR y Real-Time PCR. Para ello se diseñaron primers específicos que reconocen las isoformas 120 y 164 de VEGF y FGF-10. Distintas regiones del cerebro de rata (corteza, estriado, hipotálamo, hipocampo) fueron analizadas. Resultados: La isoforma preponderante en todas las regiones analizadas fue VEGF164, observándose variaciones en la proporción en que las

dos isoformas se encuentran expresadas. VEGF164/VEGF120 fue mayor en hipotálamo (HT) que en corteza (C) y estriado (E) y a su vez, que en hipocampo (HC) (HT: 4.75 ± 0.47 , C: 3.56 ± 0.59 , E: 3.53 ± 0.48 , HC: 2.28 ± 0.32) ($p < 0.05$). Por otra parte, los niveles de VEGF164/FGF-10 presentan niveles similares en hipotálamo y corteza (HT: 25.34 ± 3.29 , C: 19.4 ± 3.41), existiendo mayores variaciones en estriado (54.67 ± 18.59) y en hipocampo (5.8 ± 0.57) ($p < 0.05$). Conclusiones: Estos resultados preliminares sugieren que cada una de las isoformas de VEGF puede llegar a tener una función específica dentro de las distintas regiones del cerebro. Asimismo, esta expresión diferencial junto con la de FGF-10 sugiere la posibilidad de vincular la misma con ciertas funciones características de cada región cerebral.

481. (7293) ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN NEURONAS Y SINAPSIS TRAS UN TRATAMIENTO CRÓNICO CON UN AGONISTA DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES (WIN 55,212-2). EVRARD, SG; TAGLIAFERRO, P; ONAIVI, ES; LUJILDE, NJ; RAMOS, AJ; BRUSCO, A

Instituto de Biología Celular y Neurociencias «Prof. E. De Robertis», Facultad de Medicina, UBA Department of Biology, William Paterson University, Wayne, NJ 07470, USA

El receptor cannabinoide CB1 es uno de los receptores acoplados a proteína G más abundantes del cerebro. Su ubicación presináptica sugiere que los cannabinoideos cumplen un rol en la modulación de la liberación de los neurotransmisores desde las terminales presinápticas. En este trabajo analizamos los cambios morfológicos inducidos por un tratamiento crónico con un agonista sintético del receptor cannabinoide, el WIN 55,212-2. Estudiamos cuatro áreas cerebrales en las que el receptor se halla en alta densidad: el área CA1 del hipocampo, el cuerpo estriado, el cerebelo y la corteza frontal. Un grupo de ratas Wistar macho (150-170 g) recibió durante 14 días, dos dosis diarias de 4 mg/kg de WIN 55,212-2, por vía subcutánea. El grupo control recibió inyecciones de vehículo (dimetilsulfóxido). Por inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes se estudió la expresión de proteínas del citoesqueleto neuronal (neurofilamentos de 160 y 200 kDa y MAP-2), sinaptofisina (Syn; un marcador de vesículas sinápticas) y proteína gliofibrilar ácida (GFAP; la principal proteína citoesquelética astrogliar). Con microscopía electrónica se realizaron estudios ultraestructurales de las sinapsis. Tras el tratamiento, en las cuatro áreas se observó un aumento significativo en la expresión de Nf-160, Nf-200 y MAP-2 pero no se hallaron cambios en la expresión de la GFAP. Se observaron aumentos en la expresión de la Syn y cambios en la ultraestructura sináptica, principalmente en el cerebelo y en el hipocampo. Estos cambios estructurales y ultraestructurales podrían representar evidencias morfológicas de un fenómeno de plasticidad neuronal en el que estarían involucrados los receptores cannabinoideos. Realizado con subsidio UBACYT M-072.

482. (7323) MÁS ALLÁ DE DEJAR DE BEBER. LAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS INDUCIDAS EN EL CEREBRO DE LA RATA POR UNA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL ETANOL NO SE RECUPERAN COMPLETAMENTE, INCLUSO TRAS UNA PROLONGADA ABSTINENCIA. MIROCHNIC, S; DUHALDE VEGA, M; EVRARD, SG; CALTANA, L; TAGLIAFERRO, P; RAMOS, AJ; BRUSCO, A

Instituto de Biología Celular y Neurociencias «Prof. E. De Robertis», Facultad de Medicina, UBA

El etanol (EtOH) es la droga de mayor abuso mundial. Crónicamente, causa graves trastornos mnésicos y cognitivos. Altera la actividad del SNC a través de interacciones directas con receptores neuronales, pero también al modificar las relaciones neuro-gliales (RNG). Los cambios en la expresión de la proteína S100B (factor neurotrófico de origen astrogliar) parecen estar involucrados en las alteraciones neuronales. Hemos evaluado aspectos de la RNG tras la recuperación por abstinencia. Un gru-

po de ratas Wistar macho fue expuesto a EtOH 6,6% v/v en el agua de bebida por 6 semanas; a un subgrupo se lo sacrificó y estudió inmediatamente al terminar la exposición y a otro subgrupo luego de 10 semanas adicionales de recuperación durante las que tomaron agua. Dos grupos de animales control bebieron solo agua. Los cerebros de las ratas se procesaron por inmunocitoquímica con anticuerpos para GFAP (proteína gliofibrilar ácida, proteína del citoesqueleto astrocitario), S100B, y MAP-2 (proteína asociada a microtúbulos presente principalmente en las dendritas). Por análisis de imágenes se estudiaron tres áreas prosencefálicas estrechamente vinculadas con actividades cognitivas: el área CA1 del hipocampo, el cuerpo estriado y la corteza frontal. Resultados: el área celular de los astrocitos GFAP+ aumentó en las tres áreas tras la intoxicación y retornó a valores normales tras la abstinencia. La inmunomarcación de la proteína S100B disminuyó en las tres áreas tras la intoxicación y se recuperó tras la abstinencia. El área relativa cubierta por las fibras MAP-2+ disminuyó en las tres áreas tras la intoxicación y, tras la abstinencia, se recuperó en el hipocampo y el cuerpo estriado pero no lo hizo en la corteza frontal. La abstinencia prolongada atempera el daño crónico provocado por el EtOH a las RNG pero no logra restituir las a niveles basales. Realizado con subsidio UBACYT M-072.

483. (7390) LA PROTEÓLISIS INSUFICIENTE DE PEPTIDO A β POR LA ENZIMA DEGRADADORA DE INSULINA (EDI) COMO POSIBLE MECANISMO INVOLUCRADO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA). LEAL, MARÍA CELESTE; DORFMAN, VERÓNICA; MATHOV, IRINA; CASTAÑO, EDUARDO M.; MORELLI, LAURA

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET. Facultad de Farmacia y Bioquímica

El depósito progresivo en el cerebro de A β en forma de placa senil (PS) sería la causa del deterioro cognitivo asociado a EA. Uno de los mecanismos propuestos es una falla en su proteólisis. Dentro de las enzimas que degradan A β está EDI, metalo-proteasa neutra y ubicua. Estudiamos el rol de EDI en la formación de la PS. Usamos como modelo experimental al ratón transgénico Tg2576 (Tg) que sobre-expresa el gen del precursor de A β mutado y produce PS similares a las de EA. Trabajamos con Tg y controles (NTg) divididos en 4 grupos (N=6/grupo): 4-5, 10-13, 15-17, 23-24 meses. Los ratones fueron anestesiados, perfundidos con PBS, un hemisferio cerebral se usó para aislar RNA y proteínas y el otro se fijó con PFA 4%. Determinamos los niveles proteicos en la fracción soluble (100.000xg) por western blot y ELISA con anticuerpos poli y monoclonales anti-EDI desarrollados por nosotros. Cuantificamos el mRNA optimizando una RT-PCR competitiva. Estudiamos sobre cortes coronales la distribución de EDI y A β mediante inmunohistoquímica e hibridización in situ (con sondas preparadas a partir del cDNA de EDI). Encontramos que hasta los 12 meses de edad el contenido de A β 40 y A β 42 se mantiene bajo (65 y 94,9 pg/mg, respectivamente), incrementándose exponencialmente entre los 13-15 meses (1276 y 506 pg/mg) edad en la que estos ratones comienzan a presentar PS. Localizamos EDI en hipocampo y en corteza, no encontramos co-localización con A β en PS, sugiriendo que EDI degrada A β soluble y no agregado. Los niveles de EDI soluble fueron similares entre Tg y NTg, mostrando una diferencia significativa entre animales de 4-5 y 23-24 meses ($96 \pm 0,08$ y $51 \pm 0,01$ ng/mg, respectivamente $p < 0.05$) La sincronización entre la caída de EDI y la aparición de PS indicaría una relación fisiopatogénica entre los dos eventos reforzando la hipótesis de la modulación en el cerebro de la expresión y/o actividad de EDI como blanco terapéutico en EA.

484. (7829) MODULACIÓN POR INSULINA DE DIACILGLICÉRIDO LIPASA (DGL) Y MONOACILGLICÉRIDO LIPASA (MGL) EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO. PASQUARÉ, SUSANA; SALVADOR, GABRIELA; GIUSTO, NORMA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

Se ha descrito que la Insulina y sus receptores están distribuidos en sistema nervioso central y cumplen un rol fundamental en la transmisión sináptica. Alteraciones en la acción de la insulina han sido reportadas en enfermedades neurodegenerativas. Hemos demostrado previamente que en sinaptosomas las actividades Fosfolipasa D/Fosfatidato Fosfohidrolasa/Diacilglicérido quinasa (PLD/PAP/DGK) son moduladas por insulina y modificadas por el envejecimiento. El Diacilglicerol (DAG) generado por la acción de la PAP es adicionalmente metabolizado por DGL a monoacilglicerol (MAG), y este, activamente removido por una MGL. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la insulina, sobre la DGL y la MGL en sinaptosomas de corteza cerebral de animales adultos y seniles. En ratas adultas la insulina estimuló la actividad DGL un 59% a 30 minutos de incubación. La presencia de vanadato inhibió la actividad 34% a tiempos cortos de incubación, respecto a la medida en el control. Tanto la hormona como el vanadato estimularon la metabolización de MAG 118% y 48%, respectivamente. Insulina mas vanadato produjeron una disminución de la actividad DGL 25% y 33% a los 2 y 5 min. de incubación, respectivamente, comparada a la medida en membranas incubadas con vanadato. Esta condición incrementó un 23%, la remoción de MAG. En sinaptosomas de ratas seniles la presencia de insulina o de vanadato disminuyó la actividad de DGL respecto al control desde los 5 min., siendo mayor el efecto a los 30 min. Bajo estas condiciones de ensayo MGL fue inhibida 21% y 29%, respectivamente. La presencia conjunta de insulina y vanadato inhibieron la actividad de la DGL y estimularon la de MGL en un mismo porcentaje (28%) respecto a la determinada en presencia de vanadato. Los resultados muestran una modulación diferencial de DGL y MGL por insulina tanto en sinaptosomas de ratas adultas como en seniles.

485. (8104) THE ACTIVATION OF NF-KB IS REQUIRED FOR THE LONG TERM MEMORY CONSOLIDATION IN THE PASSIVE AVOIDANCE LEARNING IN MICE. FREUDENTHAL, RAMIRO(1); BOCCIA, MARIANO(2); ACOSTA, GABRIELA(3); BLAKE, MARIANO(2); MERLO, EMILIANO(1); BARATTI, CARLOS(2) ; ROMANO, ARTURO(1)

1Lab Neurobiol de la Mem, FBMC, FCEN 2Lab Neurofarmacol Procesos de Mem, FFyB 3ININFA-CONICET. UBA.

Although is generally accepted that memory consolidation requires gene expression, only few transcription factors (TFs) were clearly demonstrated to be specifically involved in this process. Increasing research data point to the participation of Rel/NF-kB family of TFs in memory and neural plasticity. Here we found that icv post-training administration of sulfasalazine, an inhibitor of NF-kB, impairs long term memory in the one-trial stepthrough inhibitory avoidance paradigm in CF-1 mice. Furthermore, we employed another independent strategy to inhibit NF-kB in the mouse brain, administering a double stranded DNA oligonucleotide containing the NF-kB consensus sequence (kB-decoy). The icv injection of 60 ug of kB decoy 2 h before training induced amnesia, while 60 ug of double stranded DNA oligonucleotides with one base mutation in the consensus sequence (mut-kB-decoy) did not affected long-term memory. NF-kB was inhibited in hippocampus 2 h after icv injection of 60 ug of kB-decoy, but no inhibition was found 2 h after mut-kB-decoy injection, estimated by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). A temporal course of hippocampal NF-kB activity after training was determining by EMSA. Unexpectedly, an inhibition of NF-kB was found 15 min after training session in the shocked-trained group but not in the unshocked-control group. Forty five min after training, hippocampal NF-kB was activated in both shocked and unshocked groups, returning to basal levels 2 hs after training. Based on the latter result, we propose that the activation of NF-kB in hippocampus is part of the molecular mechanism involved in the storage of contextual features that constitutes the conditioned stimulus representation. The results presented here provide the first evidence supporting that NF-kB activity is regulated in hippocampus during consolidation,

stressing the role of this TF as a conserved molecular mechanism for memory storage.

ONCOLOGÍA 1: CÁNCER DE MAMA

486. (7051) LA PROGRESIÓN DE TUMORES MAMARIOS HORMONO-DEPENDIENTES INDUCIDOS POR EL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO (MMTV) OCURRE POR SELECCIÓN DE CLONES CON EVENTOS INSERCIONALES PRE-EXISTENTES. GATTELLI, ALBANA (1) ; ZIMBERLIN, MARÍA NOEL (1); CASTILLA, LUCIO H. (2); KORDON, EDITH (1)

(1) ILEX-CONICET, Medicina Experimental, IHEMA, Academia Nacional de Medicina. (2) University of Massachusetts Medical School, Program in Gene Expression and Function, USA

Hemos mostrado anteriormente que la progresión de tumores mamarios inducidos por MMTV de un comportamiento preñez-dependientes (PD) a uno preñez-independientes (PI) está asociada a la aparición de nuevos sitios de inserción virales observables por análisis de Southern blot. El objetivo del presente trabajo fue determinar si estos eventos insercionales habían ya ocurrido, en subpoblaciones minoritarias, cuando el tumor aún presentaba un fenotipo PD, o si, en cambio, estas inserciones resultaban en un abrupto cambio de comportamiento, por lo cual estarán ausentes en los pasajes PD más tempranos. Con este propósito, se aislaron y clonaron 6 sitios de inserción diferente asociados a adquisición del fenotipo PI de 5 líneas tumorales in vivo por la técnica de PCR inversa (IPCR). A partir de la secuenciación de los clones obtenidos pudieron conocerse las secuencias genómicas adyacentes al sitio de inserción del MMTV. Contando con esta información, se diseñaron primers correspondiente a estas secuencias para evaluar, por reacciones de PCR, la presencia de las inserciones halladas en pasajes tumorales PD en los cuales las bandas correspondientes no era visibles por análisis de Southern blot. Los resultados muestran que en todos los casos, las inserciones de MMTV halladas en pasajes PI estaban ya presentes en los pasajes PD originales. Esta evaluación se llevó a cabo cualitativamente por corrida electroforética de los productos de las reacciones de PCR en geles de agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. Asimismo, por reacciones de PCR en «tiempo Real» se encontró que durante la progresión, el incremento relativo medio de las subpoblaciones conteniendo las inserciones aisladas fue de 86.0±7.2%. La progresión hacia la hormono-independencia observada en nuestro modelo se produce mayormente por la selección de mutaciones ya presentes en etapas tempranas que muestran un comportamiento hormono-dependiente.

487. (7338) CARACTERIZACION HISTOLOGICA, ULTRAESTRUCTURAL E INMUNOHISTOQUIMICA DE NEOPLASIAS DE MAMA INDUCIDAS POR EL VIRUS POLIOMA MURINO. PONTILLO, CAROLINA; SANJUAN, NORBERTO

Laboratorio De Patologia Experimental. Departamento De Microbiologia, Facultad De Medicina (UBA)

El virus Polioma puede inducir neoplasias en ratones C3H BiDa y es empleado como prototipo de un virus oncogénico con DNA. Las neoplasias son múltiples y simultáneas incluyendo las de parótida, timo, foliculo piloso, riñon, hueso y glándula mamaria. En presentaciones anteriores hemos descrito que el virus se comporta de manera diferente en neoplasias de distinto linaje. Mientras que en los tumores de foliculo piloso se generan partículas virales infecciosas a medida que las células matriciales se van diferenciando, en los timomas se expresa el genoma viral completo pero no hay encapsidación de partículas infectantes. En este trabajo hemos caracterizado las neoplasias de mama inducidas por el virus. Se inocularon 20 ratones C3H BiDa menores de 24 hs de edad por vía subcutánea con 5 x 10(5) upf de

la cepa A2 de Polioma. A partir de los 3 meses post-infección (pi) se desarrollaron neoplasias de mama en la totalidad de los animales, independientemente de que hubieran sido machos o hembras. Se detectaron un promedio de 3 neoplasias por animal, que alcanzaron tamaños de hasta 2,5 cm de diámetro. Desde el punto de vista histológico son adenocarcinomas intraductales de mama, moderadamente diferenciados, algunos cribrados y otros papilares, no infiltrantes ni metastásicos. Las tinciones de PAS y Alcian Blue confirmaron la clasificación como adenocarcinomas al detectar cantidades variables de secreciones mucopolisacáridas ácidas, básicas y neutras. Las neoplasias no tienen un abundante estroma y la distribución de las fibras reticulares coincidió con la observable en carcinomas. Por microscopía electrónica se confirmó la formación de glándulas abortivas y la existencia de microvellosidades apicales. En todos los casos se detectó la presencia de la proteína mayor de la cápside viral, VP-1 por inmunoperoxidasa sobre cortes histológicos y por western blot. No obstante, no se recuperaron virus infectivos. Se concluye que en los adenocarcinomas de mama, Polioma expresa todo su genoma pero no produce virus infectivos.

488. (7529) EXPRESIÓN DE RECEPTORES ALFA 2-ADRENÉRGICOS EN DIFERENTES LÍNEAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANA POR INMUNOCITOQUÍMICA. PÉREZ, CECILIA; BRUZZONE, ARIANA; LÜTHY, ISABEL

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Habíamos descrito anteriormente la expresión de receptores alfa2- adrenérgicos en líneas tumorales mamarias humanas por RT-PCR e indirectamente por unión de un radioligando específico. Sin embargo, no habíamos evaluado su presencia por inmunocitoquímica. Con el objetivo de determinar los subtipos de receptores alfa2-adrenérgicos presentes en diferentes líneas tumorales mamarias humanas y su localización, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica y de inmunofluorescencia. Para ello se sembraron células IBH-6 e IBH-7 (anteriormente desarrolladas en el laboratorio), además de MCF-7, en multicámaras comerciales de 8 celdas y se incubaron en medio de cultivo 10% SFB hasta semiconfluencia y posteriormente dos días en medio de cultivo con 2% SFB adsorbido. Las células fueron permeabilizadas y se utilizaron anticuerpos policlonales de Santa Cruz Biotechnology específicos para los subtipos 2[B] y 2[C]. Se utilizó luego el kit de Dako que incluye un anticuerpo biotinilado, estreptavidina peroxidasa y diaminabenzidina. Se contaron entre 300 y 1300 células para calcular el HScore. La inmunocitoquímica indicó que todas estas líneas tumorales mamarias humanas presentaron una fuerte marcación con los anticuerpos para los subtipos 2[B] y 2[C]. El subtipo 2[B] mostró fundamentalmente marcación en la membrana plasmática, aunque también citoplasmático, mientras que el subtipo 2[C] mostró una localización difusa en el citoplasma, y particularmente perinuclear. Por ejemplo, en las células MCF-7 se obtuvo un HScore de 375 para el 2[C], y de 351 para el 2[B] comparado con 121 en el control negativo. La inmunofluorescencia en microscopio confocal para la línea IBH-6, confirmó tanto la expresión como la localización por este método. Concluimos que los receptores 2[B] y 2[C] se expresan en las líneas de cáncer de mama estudiadas, y que la localización coincide con la descrita en otros tejidos, en membrana y citoplasma para el subtipo alfa [B] y distribuida en toda la célula, pero especialmente perinuclear para el alfa 2[C].

489. (7553) INTERACCIÓN DE CATECOLESTRÓGENOS CON RECEPTORES ALFA2-ADRENÉRGICOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO MCF-7. CHIESA, IG-NACIO; LÜTHY, ISABEL

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Habíamos descrito que las células de cáncer de mama humano MCF-7 expresan receptores alfa[2]-adrenérgicos (RA-A) y que su estimulación está asociada con un aumento de la proliferación celular. Se ha descrito una posible acción carcinogénica de catecolestrógenos, productos del metabolismo del estradiol, además

de un efecto proliferativo. Estos compuestos se unen a receptores beta pero no a alfa[1]- adrenérgicos, desconociéndose su acción sobre RA-A. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si los catecolestrógenos pueden ejercer parte de su acción por unión a RA-A. Para ello se incubaron células MCF-7 en medio DMEM/F12 con 2% de suero fetal bovino adsorbido y se realizaron incubaciones durante 3 días en presencia de catecolestrógenos, en presencia o ausencia del antagonista alfa2-adrenérgico yohimbina o del antiestrógeno puro ICI 182780. Para los ensayos de competencia de la unión de (3)H-rauwolscina tritida se incubaron las células durante 30 min con una concentración 4 nM de este compuesto y concentraciones crecientes de catecolestrógenos no radiactivos. Los catecolestrógenos estimularon significativamente la proliferación celular un promedio del 20%, con una EC50 de 28,8 pM para 2-hidroxiestrone, 2OHE1; 50,8 pM para 2-hidroxiestradiol, 2OHE2; 2,43 nM para 4-hidroxiestrone, 4OHE1 y 0,359 nM para 4-hidroxiestradiol, 4OHE2. Se analizó la reversión de esta estimulación por yohimbina, un antagonista específico del RA-A. Este compuesto revirtió el efecto, ejemplo: 2OHE1 a un EC50 de 0,413 μM aunque el antiestrógeno puro ICI 182780 fue más efectivo (EC50: 88,75 nM). Por otro lado, tres de los cuatro catecolestrógenos compitieron significativamente la unión de rauwolscina tritida con un EC50 de 0,407 nM para 2OHE1, 0,784 μM para 2OHE2 y 25,26 nM para 4OHE1, sin competencia por 4OHE2. Concluimos que si bien los catecolestrógenos ejercen parte de su acción proliferativa a través de su unión a receptores estrogénicos como ya había sido descrito, parte de esta acción se debería a su unión a receptores alfa[2]-adrenérgicos.

490. (7615) ACCIÓN DE COMPUESTOS ADRENÉRGICOS SOBRE CÉLULAS PROVENIENTES DE TUMORES MAMARIOS MURINOS. BRUZZONE, ARIANA; LANARI, CLAUDIA; LÜTHY, ISABEL

Instituto de Biología y Medicina Experimental

En trabajos previos describimos la acción de agonistas y antagonistas alfa[2]-adrenérgicos sobre diferentes líneas de cáncer de mama humana. Con el objetivo de estudiar la acción de estos compuestos sobre modelos tumorales in vivo, comenzamos por evaluar su acción sobre líneas tumorales murinas, como así también la presencia de dos subtipos, alfa[2C] y alfa[2B] del receptor. Se utilizó una línea epitelial derivada de un tumor inducido por medroxiprogesterona: MC4-L5, una fibroblástica MC4-L4F y fibroblastos estromales obtenidos por cultivo primario del tumor C4-HD. Las células se incubaron por 48 horas con agonistas alfa[2] (clonidina, dexmedetomidina), beta (isoproterenol) y alfa[1]-adrenérgicos (fenilefrina); en presencia de 1% SFBA. La presencia de receptores alfa[2]-adrenérgicos fue evaluada mediante inmunocitoquímica con anticuerpos policlonales de Santa Cruz Biotechnology. En la línea epitelial MC4-L5, la clonidina provocó un aumento dosis respuesta en la incorporación de (3)H-timidina desde una concentración de 10 pM: 132.59 ± 4.17% del control, p<0.01. La dexmedetomidina también tuvo un efecto similar: 146.69 ± 18.58%, p<0.01. El isoproterenol y la fenilefrina disminuyeron la incorporación de (3)H-timidina a partir de una concentración de 10 pM y 0.1 nM respectivamente: 64.06 ± 4.51%, p<0.01; 74.47 ± 3.93% p<0.01. Anteriormente habíamos observado un efecto similar de estos compuestos en células tumorales humanas. El análisis inmunocitoquímico de la línea epitelial y de los fibroblastos mostró tinción fuertemente positiva para el receptor alfa[2C] en citoplasma y en membrana celular. Para el subtipo alfa[2B], la marca fue predominantemente en membrana citoplasmática. Concluimos que las células epiteliales responden a la incubación con compuestos alfa[2]-adrenérgicos con un aumento de la proliferación celular. Tanto los los fibroblastos de tumores mamarios como las líneas estudiadas expresan receptores alfa[2]adrenérgicos.

491. (7647) EFECTO DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS ALFA[2]-ADRENÉRGICOS SOBRE TUMORES MAMARIOS MURINOS. BRUZZONE, ARIANA; LANARI, CLAUDIA; LÜTHY, ISABEL

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Habíamos descrito el efecto estimulador de agonistas alfa[2]-adrenérgicos sobre líneas tumorales de mama humana. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto in vivo de agonistas y antagonistas sobre tumores mamarios murinos hormono-dependientes. Se utilizó el modelo de tumores transplantables de mama inducidos por acetato de medroxiprogesterona, MPA. Los tumores C4-HD y CC4-HD se inocularon a ratones BALB/c, con pellets de MPA solamente para el C4HD. Diariamente se administraron agonistas: clonidina -clo- 0.1 mg/Kg o dexmedetomidina -dex- 0.05 mg/Kg; antagonista: yohimbina 0.5mg/Kg; o ambos. El grupo control recibió el vehículo. Se realizaron cultivos primarios para evaluar la sensibilidad a clo in vitro. Para inmunohistoquímica se utilizaron anticuerpos policlonales de Santa Cruz Biotechnology. Clo estimuló el crecimiento del tumor CC4-HD de manera significativa con respecto al grupo control: ej. día 10: 254,94 ± 27,90 mm³ vs. 172,37 ± 37,49; p<0.01. El antagonista revirtió este efecto: 111,90 ± 25,14 mm³; p<0.01, aunque se comporta como agonista parcial cuando se lo inocula solo: 282,74 ± 51,71 mm³. Sin embargo en todos los grupos se observa regresión tumoral luego del día 8, por ausencia de MPA. Los agonistas provocaron un aumento significativo del crecimiento tumoral de C4-HD, ej. día 14: clo: 595,86 ± 50,57 mm³, dex: 472,99 ± 71,35 mm³ vs. 233,74 ± 7,54 mm³. El efecto de clo sobre la proliferación celular fue estudiado en cultivos primarios de C4-HD. La incubación con clo provocó un aumento dosis-respuesta en la incorporación de (3)H-timidina en todos los casos. Los tumores que crecieron con los agonistas mostraron ser más sensibles: EC50=0.36 nM y 1,28 fM para clo y dex vs. 2,57 nM. Con respecto al estudio inmunocitoquímico, los cortes histológicos muestran marcación para alfa[2C] y alfa[2B] en el estroma circundante a los nidos tumorales y marcación tenue en las células del parénquima. Concluimos que in vivo los compuestos alfa[2]-adrenérgicos aumentan el crecimiento tumoral.

492. (7827) INTERACCIÓN ENTRE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ALFA (RE) Y RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP) EN EL CRECIMIENTO DE CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS PROGES-TÁGENO-DEPENDIENTES. SOLDATI, ROCÍO; GIULIANELLI, SEBASTIÁN; LAMB, CAROLINE; HELGUERO, LUISA A.; WARGON, VICTORIA; MOLINOLO, ALFREDO; LANARI, CLAUDIA

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

Hemos demostrado el papel clave de los receptores de progesterona en el crecimiento tanto progestágeno dependiente como independiente de carcinomas mamarios murinos en experimentos in vivo e in vitro. Por otra parte demostramos inhibición de la proliferación celular inducida por progestágenos con estrógenos, antiestrógenos puros y nucleótidos antisentido de RE. Estos resultados paradójicos nos llevaron a plantear la hipótesis de que es necesaria la interacción entre RE sin unir al ligando y RP para estimular la proliferación mediada por progestágenos. Este tipo de interacciones han sido descritas a nivel citoplasmático. En este trabajo nos focalizamos en investigar la interacción entre ambos receptores en estudios de inmunoprecipitación y co-localización con microscopía confocal. En extractos de tumores CC4-HD extraídos de ratones tratados con MPA, se hicieron inmunoprecipitados con anticuerpos anti RE, MC-20, y se revelaron con anticuerpos anti RP, Ab 7 o C-20, o viceversa se inmunoprecipitaron con anti RP, Ab1 o Ab7 +Ab5, y revelaron con anti RE, MC-20. En ambos casos se obtuvieron resultados positivos y en el caso de los anticuerpos policlonales la señal pudo ser desplazada al usar los péptidos controles. Al inmunoprecipitar con RE y revelar con RP se pudo determinar que ambas isoformas interactúan con el RE. Se realizaron técnicas inmunohistoquímicas de doble marcación en duplicados de cortes de criostato de tumores de C4-HD tratados con MPA usando anticuerpos monoclonales, RE: Ab 10, RP: Ab 7, y policlonales, RE: MC20 y RP: C-19 y C-20. Se observó co-localización nuclear entre RE y

RP, n=3. Se obtuvieron resultados similares usando los anticuerpos dirigidos a las formas fosforiladas en ser 294 de RP y en ser 167 de RE. Estos resultados sugieren que interacciones entre ambos receptores a nivel nuclear podrían ser necesarias para activar la proliferación celular.

493. (7852) RECEPTORES DE PROGESTERONA Y EFECTOS NO GENÓMICOS DE PROGESTÁGENOS EN CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS EXPERIMENTALES. BOTTINO, MARÍA CECILIA; SOLDATI, ROCÍO; MONDILLO, CAROLINA; PIGNATARO, OMAR; LÜTHY, ISABEL; GOROSTIAGA, MARÍA; LANARI, CLAUDIA

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

Utilizando extractos totales de tumores mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona, MPA, hemos demostrado la presencia de sitios de unión a progesterona de alta afinidad y baja capacidad, Kd: 43± 9 pM; Q= 9.3 fmol/mg prot, así como también los clásicos de baja afinidad y alta capacidad. In vitro, el MPA ejerce un efecto estimulador en cultivos primarios produciendo una curva con dos pendientes, una a muy bajas concentraciones, EC50: 1.5 ± 0.7 fM, y otra a valores compatibles con la Kd descrita para el receptor de progesterona, RP, EC50: 0.33± 0.3nM. En este trabajo, utilizando cultivos primarios de CC4-HD y células de la línea celular MC4-L5, evaluamos la posible localización del RP clásico en la membrana celular e investigamos el efecto de MPA 10(-11)M en los niveles de AMPc y en la expresión de MAPK fosforiladas luego de diez minutos. Por Western Blot en extractos purificados de membranas, utilizando dos anticuerpos diferentes, C-19 policlonal y Ab7 monoclonal, pudimos detectar bandas inmunoreactivas correspondientes a ambas isoformas de RP, A de 83kDa y B de 115kDa, además de bandas comunes de 145 kDa y de 110 kDa. Estudios de microscopía confocal, usando progesterona acoplada a BSA-FITC sugieren la presencia de sitios que unen a progesterona en la membrana celular. Estudios de inmunocitoquímica usando anticuerpos anti RP y estudios de co-localización con caveolina-1 sugieren presencia de RP clásicos en la membrana celular con distribución polarizada. Los tratamientos con MPA 10(-11)M aumentan los niveles de AMPc, 5822± 1021 vs Control:709 ± 60 fmoles AMPc/10(6)células, RIA p<0.05, y fosforilación de MAPK (Western Blot e inmunocitoquímica). Estos datos demuestran que en la membrana celular hay proteínas con inmunoreactividad coincidente con los RP clásicos y podrían mediar los efectos no genómicos rápidos inducidos por concentraciones de progestágenos menores al Kd del receptor clásico.

494. (7942) RESISTENCIA DE LA CEPA DE RATONES C57BL/6 A LA CARCINOGENESIS MAMARIA POR ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA). BOLADO, JULIETA A.; VANZULLI, SILVIA; BENAVIDES, FERNANDO; CONTI, CLAUDIO; MOLINOLO, ALFREDO; LANARI, CLAUDIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental; Acad. Nac. Medicina Buenos Aires. M.D. Anderson Cancer Center, Texas.

Hemos desarrollado un modelo experimental de carcinogénesis mamaria por progestágenos en ratones BALB/c. Se evaluó la capacidad de MPA de inducir carcinomas mamarios en hembras C57BL/6 teniendo en cuenta que se comporta como carcinógeno mamario en la cepa BALB/c. Se estudiaron los cambios morfológicos de las glándulas mamarias y salivares en hembras tratadas con MPA o progesterona, Pg, durante dos meses en comparación con BALB/c. En un protocolo realizado con ambas cepas en paralelo administrando 40 mg MPA depot cada dos meses durante 1 año se observaron 0/31, número de tumores/animales iniciales, en C57BL/6 vs 7/36 en BALB/c, p<0.05. No se registraron tumores mamarios en 35 controles estudiados de cada cepa. Se repitió el experimento sólo en C57BL usando

pellets de 40mg MPA cada 6 meses. Luego de 14 meses de observación no aparecieron tumores siendo el control histórico de BALB/c para este protocolo: 14/44. Se evaluaron las glándulas mamarias de BALB/c y C57BL/6 por montaje total y por cortes histológicos a las 1, 2, 4 y 8 semanas de implantados los pellets de 40mg Pg o MPA observándose una notable menor respuesta proliferativa a ambos progestágenos en las glándulas mamarias de C57BL/6, ya evidente a la semana del tratamiento. En las glándulas salivares de los animales tratados con MPA se observaron las típicas hiperplasias de los conductos, característica androgénica del MPA ya conocida, no observándose diferencias entre cepas. Se concluye que la cepa C57BL/6 es resistente a la carcinogénesis mamaria por MPA; esta resistencia podría ser consecuencia de la menor respuesta al efecto gestacional del MPA.

REPRODUCCIÓN 2

495. (6936) INFLUENCIA DE LA MUCIFICACION DEL CUMULUS EN LAS ETAPAS DE PRODUCCION DE EMBRIONES BOVINOS IN VITRO. GUTNISKY, CYNTHIA; PINTOS, LAURA; DALVIT, GABRIEL; THOMPSON, JEREMY (1); BECONI, MARTHA; CETICA, PABLO

Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA; (1) Reproductive Medicine Unit, TQEH, Adelaide University

La mucificación del cumulus durante la maduración (M) de los complejos ovocito-cumulus (COCs) depende de la síntesis de ácido hialurónico (AH). Se determinó la influencia del agregado al medio de M de inhibidores (UMP, DON) y activadores (UTP) de la síntesis de AH en la expansión, proteínas y n° de células del cumulus, M meiótica del ovocito, fertilización in vitro (FIV) y desarrollo embrionario. Los COCs fueron madurados en medio 199, fertilizados con semen congelado en FIV-SOFm con o sin heparina (H) y los embriones cultivados en IVC-SOFm por 7 días. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry, las células del cumulus por Hoechst 33258 y la expansión del cumulus por su volumen. La expansión fue parcial con UMP y total con DON (P<0,05). Por la M aumentaron las proteínas/COC (1,83±0,12 vs 1,09±0,07 µg; P<0,05) y el n° de células/COC (6836±1517 vs 2646±1408; P<0,05), pero con UMP o DON no se modificaron. Si bien se observó mucificación con UTP, estos parámetros no pudieron determinarse debido a que las células se disgregaban de la matriz. Se observó buena correlación entre la cantidad de proteínas y el n° de células del cumulus (r=0,71). El % de M meiótica (88,2%) no se modificó con UMP (82,8%) o DON (91,1%), pero con UTP disminuyó (5,8%; P<0,05). El % de FIV (77,0%) decreció con UMP (41,6%) o DON (50,4%; P<0,05), efecto revertido por H. El UTP inhibió totalmente la FIV con o sin H (P<0,05). El % de blastocistos (39,1%) disminuyó con UMP (5,6%) o DON (12,6%; P<0,05), efecto revertido por H sólo en el caso del DON (36,5%). La inhibición de la síntesis de AH y mucificación del cumulus no influyen en la M nuclear del ovocito y en la velocidad de división de las células del cumulus, sin embargo aquellos procesos están implicados en la FIV y desarrollo embrionario. La inhibición de la FIV con UTP se debería a la reducción de la M del ovocito. El UMP afecta la competencia de desarrollo del ovocito por mecanismos diferentes a la inhibición de la síntesis de AH.

496. (7026) ESTUDIOS MORFOLOGICOS DE OVOCITOS PORCINOS INMADUROS Y MADURACION IN VITRO. ALVAREZ, GABRIEL; DALVIT, GABRIEL; ACHI, VERÓNICA; MIGUEZ, MARCELO (1); CETICA, PABLO

Química Biológica, (1) Producción de Porcinos, Fac. Cs. Veterinarias, UBA.

Los criterios de clasificación de ovocitos porcinos inmaduros no están estandarizados, siendo de interés seleccionar aquellos

más aptos para madurar in vitro. El objetivo fue establecer una clasificación morfológica de los ovocitos inmaduros y evaluar el índice de recuperación, viabilidad, estadio nuclear y % de maduración de cada clase. Los complejos ovocito-cumulus (COCs) inmaduros se clasificaron de acuerdo a las características del cumulus. La viabilidad se evaluó combinando Azul Tripán y diacetato de fluoresceína y el estadio nuclear con Hoechst 33342. La maduración se realizó en medio 199 y se evaluó por la presencia de metafase II. Se establecieron 6 clases de COCs: A1 cumulus íntegro denso y oscuro, A2 íntegro denso y claro, B1 corona radiata, B2 ovocitos parcialmente desnudos, C desnudos y D cumulus de células picnóticas. La recuperación de COCs/ovario (33,40±2,43) y folículo (0,76±0,02) fue superior en hembras sin servicio respecto a hembras adultas (10,00±2,52 y 0,56±0,08; P<0,05); sin embargo las proporciones de cada clase no difirieron entre las dos categorías de hembras. Los % se distribuyeron en A1 20,9; A2 20,0; B1 16,0; B2 14,6; C 26,0 y D 2,6. Los % de ovocitos vivos en A1 (93,0) y A2 (88,6) fueron superiores a los de las otras clases (P<0,05). El % de vesícula germinal entre las clases fue similar (65-71), a excepción de la clase D (50; P<0,05). No se observó relación entre el % de ovocitos vivos y el % de vesícula germinal en cada una de las diferentes clases. Los % de maduración meiótica (A1 51,7; A2 58,0; B1 54,4; B2 52,5; C 37,3 y D 0,0) están relacionados con los % de ovocitos vivos en estadio de vesícula germinal, en cambio no hubo relación con cada parámetro por separado (P<0,05). Los ovarios de hembras sin servicio serían más convenientes para recolectar un mayor número de ovocitos inmaduros. La clasificación morfológica de COCs porcinos propuesta permitiría seleccionar las clases con mayor porcentaje de ovocitos vivos en estadio de vesícula germinal aptos para madurar in vitro.

497. (7514) PAPEL DE LA LEPTINA EN EL CICLO CELULAR Y APOPTOSIS EN CÉLULAS PLACENTARIAS. MAGARIÑOS, MARÍA PAULA ; KOTLER, MÓNICA; FONTANA, VANINA; CALVO, JUAN CARLOS; VARONE, CECILIA L.

Depto. Química Biológica, FCEN, UBA., Instituto de Biología y Medicina Experimental

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 utilizaron como modelo las líneas celulares trofoblásticas JEG-3 y BeWo. Se determinó la proliferación celular por conteo de células, incorporación de 3H-timidina y análisis de FACS. El tratamiento con leptina de células BeWo produjo un aumento en la proliferación celular con un máximo de 2.75 veces a una concentración de 50 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 8.9 veces en la proliferación a los 3 días de incubación. El agregado exógeno de leptina revirtió parcialmente este efecto. Se estudió también la expresión de ciclina D1 por Western Blot, observándose un incremento dependiente de la dosis de leptina. Por otro lado la disminución de leptina endógena correlacionó con un aumento de la apoptosis celular medida por la activación de caspasa 3. Estos resultados atribuirían a la leptina el rol de hormona placentaria estimulante del crecimiento celular.

498. (7550) EFECTO DE LA PROTEÍNA DE SOBRE LA INTEGRIDAD DEL CUMULUS OOPHORUS DE RATÓN. BUSSO,

DOLORES; COHEN, DEBORA J; MALDERA, JULIETA A; GOLDWEIC, NADIA M; CUASNICÚ, PATRICIA S

Instituto de Biología y Medicina Experimental

La glicoproteína DE se asocia al espermatozoide de rata y ratón durante la maduración epididimaria y participa del proceso de fusión de gametas. Experimentos de fertilización in vitro utilizando ovocitos con cúmulus mostraron que la exposición de complejos ovocito-cúmulus (COCs) de rata y ratón a DE produciría la dispersión de las células de la granulosa. El objetivo de este trabajo fue caracterizar dicha actividad de DE sobre la integridad de COCs de ratón. Los resultados indicaron que la misma era dependiente de la concentración de proteína y del tiempo de incubación, observándose una disgregación total de los COCs por exposición a 12 μM DE por 60 minutos. Tanto DE recombinante, producida en *E. coli*, como helotermina, proteína no glicosilada 61% homóloga a DE, fueron inactivas. Si bien estos resultados sugirieron que los residuos glicosídicos podrían ser relevantes para la función de DE sobre los COCs, la proteína DE deglicosilada enzimáticamente fue tan activa como la no tratada. DE calentada a 100°C y DE reducida/alquilada fueron inactivas, indicando que los puentes disulfuro en la molécula serían relevantes para su actividad. Dado que uno de los componentes fundamentales de la matriz extracelular de COCs es el ácido hialurónico (AH), analizamos la posible actividad hialuronidasa de DE. Con este fin, estudiamos la capacidad de DE para degradar el AH tanto en su forma soluble, mediante un ensayo bioquímico basado en una curva patrón de hialuronidasa comercial, como en geles de acrilamida conteniendo AH. Ambas técnicas mostraron la incapacidad de DE de degradar al AH. En resumen, los resultados de este trabajo confirman la capacidad de DE para desintegrar los COCs, mediante una actividad específica diferente de la hialuronidasa, y sugieren que la proteína DE en el espermatozoide podría participar en etapa de penetración del cúmulus.

499. (7552) INHIBICIÓN DEL REINICIO ESPONTÁNEO DE LA MEIOSIS DE OVOCITOS BOVINOS POR FACTORES PRODUCIDOS POR UNA LÍNEA DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA BOVINA. LATTANZI, MARIANO; BARAÑO, LINO

Instituto de Biología y Medicina Experimental

El reinicio espontáneo de la meiosis ocurre cuando los ovocitos son aislados de los factores inhibitorios presentes en el folículo. La línea celular clonal BGC-1/A4, obtenida en nuestro laboratorio, presenta características similares a células de la granulosa de folículos inmaduros y es capaz de modular la maduración in vitro de ovocitos bovinos. Nuestro objetivo fue caracterizar el efecto de las células BGC-1/A4 durante la maduración in vitro de ovocitos bovinos. Para esto, los complejos cúmulus-ovocito (CCOs) fueron madurados por 20 hs en medio DMEM-F12/TCM199 (1:1) con 5% FBS sobre monocapas de células BGC-1/A4 (grupo A4) o en ausencia de células (grupo Control). Luego se evaluó el estadio de la meiosis y los CCOs fueron clasificados en: Vesícula Germinal (VG), Metafase I (MI), o Metafase II (MII). Cuando los CCOs fueron madurados en contacto con células BGC/A4 se observó una inhibición tanto de la expansión del cúmulus como del reinicio de la meiosis (VG: 69±4%; MI: 22±9%; MII: 9±5%) con respecto al grupo Control (VG: 4±0.5%; MI: 27±1%; MII: 69±2%; *p<0.01). Ninguno de estos efectos pudo ser revertido por el agregado de EGF o FSH durante la maduración. La meiosis también fue inhibida cuando se evitó el contacto directo entre los CCOs y la monocapa de células. Sin embargo, el medio condicionado de las células BGC-1/A4 no reprodujo el efecto inhibitorio aún cuando fue renovado cada 2 hs. Finalmente, los efectos inhibitorios sobre la meiosis y la expansión del cúmulus fueron revertidos cuando los CCOs del grupo A4 fueron cultivados por un segundo período de 20 hs en condiciones control (MII: 7±1% vs. 57±7%; p<0.01). Estos resultados sugieren que las células BGC-1/A4 inhiben reversiblemente la expansión del cúmulus, el reinicio espontáneo de la meiosis y las acciones de FSH y EGF sobre los CCOs

a través de factores solubles, que serían lábiles o producidos en bajas cantidades. La línea BGC-1/A4 parece ser un buen modelo para el estudio de factores reguladores intraováricos.

500. (7570) EFECTO DE CITOQUINAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEASAS EN CULTIVO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS. FONTANA, VANINA; MAGARIÑOS, MARIA PAULA; KRENEK, CECILIA; VARONE, CECILIA; CALVO, JUAN CARLOS

Depto. Química Biológica, FCEN, UBA. Instituto de Biología y Medicina Experimental

Las células citotrofoblásticas (CTB), expresan metaloproteasas (MMPs) que digieren los constituyentes de la matriz extracelular endometrial. Se demostró que MMP-9 de CTB media la invasión endometrial in vitro. Aunque las CTB se comportan como células metastásicas in vivo poseen una etapa invasiva regulada. Esta regulación espacio-temporal sería mediada parácrinamente por factores uterinos (TNF, TGF- β , IL-1 y 6, LIF, IGFBP-1) y autócrinamente por factores trofoblásticos (Leptina, hCG). Objetivo: clarificar el mecanismo de invasión trofoblástica mediante el estudio del efecto de Leptina e IL-1 β sobre la actividad de MMPs en cultivo de CTB. Se cultivaron células JEG-3 en DMEM- SFB1%, con concentraciones crecientes de Leptina [0-500 ng/ml], antisense para Leptina [0-5 μM], IL-1 β [0-80 pg/ml] y mezcla de Leptina-antisense. Después de 3 días, se realizó un análisis zimográfico de los medios. Las bandas de digestión fueron analizadas por densitometría (Scion Image). Resultados: El cultivo de JEG-3 en presencia de Leptina [50 ng/ml] mostró un incremento de cinco veces en la actividad de MMP-2. De acuerdo con éstos se observó una disminución del 63% en la actividad de MMP-2, cuando el cultivo se realizó con antisense 5 μM . En presencia de IL-1 β la actividad superó en cuatro veces a la del grupo control. El cultivo en presencia de ambas citoquinas manifestó un antagonismo en la estimulación de la actividad de MMP-2 que la expresada individualmente. La leptina y la IL-1 β incrementan la actividad de MMP-2 en células JEG-3, aunque su combinación parecería disminuir esta actividad. Así las células trofoblásticas de la placenta, bajo la influencia de dichas citoquinas, incrementarían su actividad invasora mediadas por MMPs dependiendo de la presencia o ausencia de una o ambas citoquinas pudiendo comprometer el progreso de un embarazo normal.

501. (7581) PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA HUMANA «ARP» EN LA INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-ZONA PELLUCIDA Y SU POSIBLE RELEVANCIA PARA LA FERTILIDAD HUMANA. BUSSO, D (1); GOLDWEIC, N (1); MALDERA, J (1); RAFFO, F (2); BLAQUIER, J (2); COHEN, D (1); CUASNICU, P (1)

(1) *IBYME-CONICET*, (2) *FERTILAB, Buenos Aires*

La proteína epididimaria humana ARP, al igual que su homólogo en roedores DE, se asocia al espermatozoide (ES) y participa en el proceso de fusión de gametas. Evidencias recientes muestran que DE participaría además en la etapa de interacción con la zona pellucida (ZP). Con el fin de establecer la participación de ARP en esta etapa de la interacción de gametas, se evaluó el efecto del anticuerpo anti-ARP sobre la unión de espermatozoides humanos capacitados a ZP humanas, utilizando el ensayo de hemizona. Los resultados mostraron que mientras una dilución 1:50 de anti-ARP no tuvo ningún efecto, la incubación de espermatozoides con una concentración mayor de dicho anticuerpo (1:10) produjo una inhibición significativa en el número de ES unidos/hemizona respecto a los controles incubados con medio solo (12±3 vs.25±5, p<0.01, n=6). Una inhibición similar fue obtenida cuando se utilizó IgG de conejo como control (12±3 vs.24±4, p<0.005, n=5). Las inhibiciones observadas no se debieron en ningún caso a un efecto del anticuerpo sobre la motilidad espermática. Estos resultados indicarían la participación de ARP tanto en la etapa de unión a la ZP, como en la de fusión de gametas establecida previamente. Por otro

lado, como una aproximación hacia el establecimiento de la relevancia de ARP para la fertilidad humana, se estudió por ELISA la presencia de anticuerpos específicos anti-ARP en sueros de pacientes inmunofértiles, considerándose positivos aquellos que presentaban un valor de absorbancia contra ARP recombinante mayor al promedio obtenido con los sueros controles más 3 desvíos estandar, observando la presencia de los mismos en un 6% de los 51 sueros estudiados. En conjunto, estos resultados apoyan la participación de ARP en el proceso de fertilización y sugieren su posible relevancia para la fertilidad humana.

502. (7602) ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA «DE» AL CUMULUS OOPHORUS DE RATÓN. BUSSO, DOLORES; DA ROS, VANINA G; MALDERA, JULIETA A; GOLDWEIC, NADIA M; CUASNICÚ, PATRICIA S

Instituto de Biología y Medicina Experimental

La proteína epididimaria DE se asocia al espermatozoide de rata y ratón durante la maduración y participa del proceso de fusión de gametas. Resultados recientes indicaron que la presencia de DE produce la desintegración de complejos ovocito-cúmulus (COCs) de rata y ratón. En este trabajo evaluamos la posible asociación de DE a COCs o a alguno de sus componentes. COCs de ratón fueron incubados con DE y la presencia de la proteína unida fue evaluada por inmunofluorescencia indirecta con anti-DE. En estos ensayos se detectó marca fluorescente en los espacios extracelulares del cúmulus, donde se encuentra la matriz caracterizada por ser rica en glicosaminoglicanos (GAGs). La ausencia de marca sobre COCs incubados en ausencia de DE o en presencia de otras proteínas confirmó la especificidad de la unión de la proteína a la matriz. Con el fin de identificar el ligando de DE en el cúmulus, diferentes GAGs puros fueron acoplados a nitrocelulosa, y las membranas incubadas con DE y reveladas por Western blot. Mientras que condroitin sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y dextrano no asociaron DE, el ácido hialurónico (AH) presentó una marca intensa que indicó la unión de DE a este GAG. La especificidad de dicha unión fue confirmada por ensayos en los que la ausencia de AH, DE o anti-DE durante el ensayo resultó en la desaparición de la marca. Asimismo, la asociación de DE a HA acoplado a la nitrocelulosa se vio incrementada a dosis crecientes del GAG. En conjunto, los resultados de este trabajo indican que DE sería capaz de unirse a la matriz del cúmulus y al AH, uno de sus componentes mayoritarios. Estas observaciones, junto con la capacidad de DE para disgregar los COCs, sugieren que la proteína en el espermatozoide podría participar en la etapa de penetración del cúmulus. La existencia de mecanismos moleculares comunes para DE en las distintas etapas de la fertilización está siendo actualmente investigada.

503. (8034) INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN CADERINA E EN GAMETAS BOVINAS. CABALLERO, JULIETA; MARÍN-BRIGGILER, CLARA; LATTANZI, MARIANO; BARAÑO, LINO; CETICA, PABLO; DALVIT, GABRIEL; VAZQUEZ-LEVIN, MÓNICA

IBYME, CONICET-UBA; Fac Cs Vet UBA

La caderina epitelial (cad-E) es una glicoproteína de adhesión que participa en la unión intercelular en forma dependiente de iones calcio. Estudios de nuestro grupo sugieren su participación en la interacción de gametas en el hombre y el ratón. El objetivo del estudio fue determinar la presencia y localización de cad-E en ovocitos y espermatozoides bovinos. Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en ovocitos de ovarios de vacas faenadas y espermatozoides previamente congelados de 5 toros del centro de inseminación artificial CIAVT. Para ello se usó un anticuerpo anti cad-E dirigido contra el dominio extracelular caderina 5 (Santa Cruz Biotech). Además se evaluó la motilidad y morfología espermáticas y el estado de capacitación y reacción acrosomal (técnica de ClorTetraCiclina; CTC). Los ensayos sobre ovocitos madurados in vitro revelaron la presencia de una señal específica para cad-E en la zona pellucida y membra-

na plasmática ovocitaria. Se obtuvieron resultados similares con ovocitos fijados antes o después de la incubación con anti cad-E. Los muestras de espermatozoides presentaron porcentajes de células mótils post-lavado y morfología espermática dentro de los valores esperados ($66 \pm 11\%$ células mótils progresivas; $86 \pm 6\%$ formas normales; media \pm DEM). Los ensayos de CTC de espermatozoides lavados en medio TALP completo revelaron la presencia de 50% de células capacitadas. Estudios de inmunocitoquímica sobre espermatozoides fijados y permeabilizados mostraron una señal muy intensa de cad-E en el borde apical del acrosoma en un alto porcentaje de las células (74 ± 6 ; rango 68-81). Esta localización se acompañó con una señal fuerte y uniforme en el resto de la cabeza o sólo en la región postacrosomal. En conclusión, caderina E se encuentra presente en ovocitos y espermatozoides bovinos, en regiones que participan en la interacción de las gametas. Estudios futuros evaluarán su participación en el proceso de fecundación.

504. (8056) ESTUDIOS SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE CADERINA E EN LA INTERACCIÓN DE GAMETAS HUMANAS. MARIN-BRIGGILER, CLARA; VEIGA, FLORENCIA; CAPECE, LORENA; VAZQUEZ-LEVIN, MÓNICA

IBYME, CONICET-UBA

Las caderinas son proteínas de membrana involucradas en la adhesión celular. Estudios de nuestro grupo describieron la presencia de la caderina epitelial (cad-E) en espermatozoides humanos, y demostraron la capacidad de un anticuerpo anti cad-E de inhibir la unión de los espermatozoides a la zona pellucida (ZP) (Vazquez-Levin et al, 2003). El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de cad-E en la reacción acrosomal y en la adhesión/fusión al ovocito. Se empleó un anticuerpo anti cad-E dirigido contra el dominio extracelular caderina 5 (Santa Cruz Biotech.). La incubación de espermatozoides capacitados con $100 \mu\text{g/ml}$ de anti cad-E no indujo la reacción acrosomal (anti cad-E= $22 \pm 6\%$, buffer= $22 \pm 5\%$, fluido folicular humano= $45 \pm 7\%$; * $P < 0,001$). En espermatozoides reaccionados se encontraron cuatro patrones de localización de cad-E: 1) «patchy» tenue en toda la cabeza ($38 \pm 6\%$), 2) segmento ecuatorial ($24 \pm 7\%$), 3) región postacrosomal ($35 \pm 6\%$), y 4) región acrosomal «patchy» fuerte ($3 \pm 3\%$) (media \pm DEM; $n=6$). La incubación con anti cad-E se hizo en combinación con la lectina Pisum sativum para evaluar solo los espermatozoides reaccionados. La participación de cad-E en la interacción espermatozoide-oolema se evaluó usando el ensayo de penetración de ovocitos de hamster sin ZP, con espermatozoides capacitados (ensayo estándar; OMS) o incubados en buffer «test-yolk» (ensayo optimizado; Smith et al, 1987). Los ovocitos de hamster mostraron inmunolocalización de cad-E en la membrana plasmática. Cuando los ovocitos fueron preincubados con anti cad-E ($20 \mu\text{g/ml}$) se observó una disminución en el % de ovocitos penetrados en el ensayo estándar (anti cad-E= $57 \pm 11\%$; Control= $91 \pm 12\%$, $P < 0,05$), y un número menor de penetraciones/ovocito en el ensayo optimizado (anti cad-E= 4 ± 1 ; Control= 7 ± 2 , $P < 0,001$). Los resultados describen la presencia de caderina E en regiones fusogénicas de la cabeza del espermatozoide humano reaccionado y sugieren su participación en la adhesión / fusión del espermatozoide al oolema.

**TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 1:
EN PROCESOS FISIOLÓGICOS**

505. (7017) ENZIMAS PROINFLAMATORIAS PARTICIPAN DE LA RESPUESTA ANGIOGÉNICA INDUCIDA POR CÉLULAS DE EPITELIO MAMARIO MURINO NORMAL (NMuMG). POCHAT, CECILIA; DE LA TORRE, EULALIA; ESPAÑOL, ALEJANDRO; DAVEL, LILIA; FISZMAN, GABRIEL; AISENBERG, JULIETA; BORDA, ENRI; SALES, MARIA ELENA

Cátedra de Farmacología-Facultad de Odontología-UBA; CEFYBO-CONICET. Area Investigación-Instituto de Oncología A. H. Roffo-Facultad de Medicina-UBA

El epitelio mamario murino normal está sometido a estímulos como los factores de crecimiento, que promueven la migración celular, la morfogénesis de ductos y la expresión de proteínas lácteas *in vitro*. En condiciones patológicas, esos mismos estímulos promoverían un cambio en la expresión proteica que llevaría a la transformación de dichas células. En los últimos años se ha vinculado la inflamación crónica con la aparición de neoplasias. Investigamos la expresión y función de enzimas proinflamatorias en células de epitelio mamario murino normal, NMuMG y su papel en la angiogénesis. Por ensayos de Western blot (Wb) y cuantificación de bandas por densitometría (D.O./mm(2)) detectamos la expresión de la isoforma neuronal de óxido nítrico sintasa (NOS1) (0,414), arginasa II (0,008) y ciclooxigenasa 2 (COX-2) (0,314) en dichas células. La actividad enzimática de estas proteínas se determinó respectivamente por la producción basal de nitrito (2,7±0,3 nmol/10(6) cél.), urea (29,25±3,8 μmol/10(6) cél.) y prostaglandina E[2] (PGE[2]) (442,1±10,9 pg/10(6) cél.) (n=3). En un ensayo *in vivo* observamos que las células NMuMG inducen una respuesta angiogénica positiva (N° de vasos/mm(2) de piel) (3,08±0,18 (n=10) y que la misma se reduce por el pretratamiento de las células con: L-NMMA, inhibidor de NOS (2,06±0,23) (n=6), NOHA inhibidor de arginasa (2,14±0,14)(n=6), indometacina (INDO), inhibidor de COX (2,32±0,18) (n=6) y NS-398 de COX-2 (2,33±0,08) (n=6). Por ensayo de Wb también detectamos expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en los lisados de células NMuMG. Concluimos que las células de epitelio mamario murino normal promueven la angiogénesis por activación de enzimas proinflamatorias como NOS1, arginasa II y COX-2. Los altos niveles de PGE(2) detectados, así como la presencia de VEGF, podrían ser los principales responsables de la inducción de la cascada angiogénica.

506. (7294) AMPc INDUCE EXOCITOSIS ACROSOMAL POR LA VÍA EPAC/RAP. BRANHAM, MARIA TERESITA; ZARELLI, VALERIA; TOMES, CLAUDIA

IHEM (CONICET): Fac. De Ciencias Médicas, Univ. Nac. De Cuyo

La reacción acrosómica (RA) es una exocitosis calcio dependiente necesaria para la fecundación. El adenosin-3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) es un mediador crucial de este fenómeno. Durante años las proteínas quinasas dependientes de AMPc fueron sus únicos receptores intracelulares conocidos. Recientemente se ha descrito un efector del AMPc llamado Epac, el cual actúa como intercambiador de nucleótidos de guanina para las proteínas Rap. Hemos desarrollado un modelo de exocitosis acrosomal en espermatozoides permeabilizados con estreptolisina O (SLO) que ha posibilitado abordar el estudio de los componentes moleculares y mecanismos de transducción de señales que participan en la RA. En espermatozoides no permeabilizados AMPc induce la RA activando la PKA, quien a su vez abre canales de calcio en la membrana plasmática. En espermatozoides tratados con SLO, la exocitosis disparada por AMPc es insensible a los inhibidores de PKA H89, péptido PKI y RpcAMPS. Así, planteamos la posibilidad de que el blanco del AMPc fuera Epac. Aquí demostramos la presencia de esta proteína en espermatozoides humanos mediante ensayos de Western blot e inmunofluorescencia. La estimulación con un análogo selectivo de Epac indujo exocitosis en una magnitud similar a la alcanzada por el calcio. El AMPc estimula la RA per se y no a través de la movilización o ingreso de calcio puesto que altas concentraciones de EGTA no atenúan el efecto. Anticuerpos específicos contra Epac bloquean la RA, demostrando el requerimiento de esta proteína. La introducción en espermatozoides tanto de anticuerpos anti-Rap, como de un dominio específico de unión a esta GTPasa, previno la exocitosis, sugiriendo la posibilidad de que la vía Epac-Rap fuera crucial en la exocitosis acrosomal. Nuestros resultados sugieren que la activación de la vía Epac/Rap, es suficiente para desencadenar todos los fenómenos inherentes a la fusión

507. (7354) EFECTO DE GENISTEÍNA SOBRE LA CONCENTRACIÓN CITOPASMÁTICA DE CA²⁺ EN MÚSCULO LISO DE AORTA DE RATA *IN SITU*. SPERONI, FRANCISCO; RAQEEB, ABDUL; OLDANI, AMANDA; SALEMME, SILVIA; REBOLLEDO, ALEJANDRO; AÑÓN, CRISTINA; TANZI, FRANCO; MILESI, VERÓNICA

Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; Dipartimento di Scienze Fisiologiche-Farmacologiche Cellulari-Molecolari, Pavia, Italia.

La genisteína (GE) presenta diferentes efectos biológicos: modulador selectivo de receptores de estrógenos, inhibidor de tirosinas quinasas y de canales de Ca²⁺ y activador de canales de K⁺ activados por Ca²⁺. Su consumo está asociado a una disminución de patología cardiovascular. Agonistas como serotonina (5-HT) y agentes despolarizantes como KCl 80 mM producen aumento del Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) y contracción del músculo liso vascular. En este trabajo se estudiaron los efectos de genisteína sobre la [Ca²⁺]_i en segmentos desendotelizados de aorta de rata, cargados con el indicador FURA-2 y excitados a 340 y 380nm. La intensidad emitida se registró a 510nm. Cuando el tejido fue perfundido con 5-HT 2μM se observó un aumento de [Ca²⁺]_i y en algunos segmentos arteriales se observaron oscilaciones de Ca²⁺ de amplitud y frecuencia variable. La GE 20μM redujo significativamente el aumento de Ca²⁺ en un 73,9±7,3% (n=11) y disminuyó la frecuencia y amplitud de las oscilaciones. Esta inhibición fue menor en presencia del bloqueante de canales de K⁺ TEA 0,5 mM (50,0±7,0 % n=11, p<0,05). El KCl 80mM indujo un aumento del [Ca²⁺]_i que fue reducido en forma reversible por la GE 20μM (19,9±4,1% de inhibición n=7, p<0,05). Además, se indagó el efecto de GE y daidzeína (análogo de la GE sin actividad inhibitoria de tirosinas quinasas) sobre el desarrollo de fuerza isométrica en anillos de aorta estimulados con 5-HT 2μM. Ambas sustancias produjeron un efecto relajante total e inmediato de la contracción (GE 99,2±7,5 % n=10 y daidzeína 108,6±10,8 % n=7, p<0,05). Los resultados obtenidos sugieren que los efectos agudos de genisteína sobre la [Ca²⁺]_i serían independientes de su acción inhibitoria de tirosinas quinasas y probablemente mediados por la inhibición de canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje y activación de canales de K⁺.

508. (7364) EL ROL DE AKT EN EL MECANISMO DE PROLIFERACIÓN DEPENDIENTE DEL ESTADO REDOX CELULAR. ANTICO ARCIUCH, VALERIA GABRIELA; GALLI, SOLEDAD; CARRERAS, MARÍA CECILIA; PODEROSO, JUAN JOSÉ

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

La proteína-quinasa B (PKB)/Akt es un importante regulador de procesos celulares como la proliferación y apoptosis celulares, la angiogénesis y el metabolismo de la glucosa. Akt se activa por diferentes estímulos que incluyen factores de crecimiento, citoquinas, hormonas esteroideas y estrés celular. En este trabajo se analizó la participación de Akt en el mecanismo de proliferación celular mediada por la acción del H₂O₂ en la línea celular NIH 3T3. El índice de proliferación determinado mediante la incorporación de (3)H timidina aumentó 30% en células tratadas con 10 μM H₂O₂ y disminuyó 50% al ser incubadas con 100 μM H₂O₂ (control: 18794 ± 5268 dpm; p< 0.05). La expresión y la activación de Akt en las fracciones subcelulares fueron analizadas mediante Western Blot. En el citosol, P-Akt aumentó 2,4 veces luego de 15 minutos de incubación con 10 μM H₂O₂. En estas condiciones, solamente la expresión de Akt-1 fue modulada, aumentando 70% respecto del control. La expresión de la isoforma Akt-2 no se vio afectada significativamente por dicho tratamiento. Al analizar la forma activada de Akt en la fracción mitocondrial se observó una disminución del 48% respecto del control luego de la exposición a 10 μM H₂O₂. La exposición de las células a 10 μM H₂O₂ resultaría en la fosforilación en tirosina de diferentes receptores de tirosin-quinasa (TKRs), en ausencia del factor estimulante. Esta

fosforilación parecería ser lo suficientemente fuerte como para inducir la activación de una serie de eventos río abajo como la activación de Akt, el tráfico diferencial de esta quinasa a mitocondrias y el posterior aumento en la tasa de proliferación.

509. (7843) PRESENCIA DE RhoA EN LOS SEGMENTOS EXTERNOS DE LOS BASTONES RETINIANOS. SU PARTICIPACION EN LA REGULACION DE LA FOSFOLIPASA D. SALVADOR, GABRIELA; GIUSTO, NORMA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

La función biológica de los segmentos externos de los bastones retinianos (ROS) es la generación de una respuesta a la luz a través de la proteína G heterotrimérica, transducina. Además de su clásico rol en la fototransducción, los ROS experimentan activos recambios de membrana y tráfico de proteínas. Previamente hemos demostrado la presencia de la fosfolipasa D (PLD) en estas membranas y su inhibición por luz. El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de activadores de la PLD en los ROS y determinar su participación en la regulación ejercida por la luz. Usando anticuerpos contra RhoA, detectamos la presencia de una proteína de 24 kDa en membranas de ROS purificados. En ROS obtenidos a partir de retinas adaptadas a la oscuridad (DROS) los niveles de RhoA fueron aproximadamente un 50 % más elevados que en membranas de ROS obtenidas a partir de retinas adaptadas a la luz (LROS). Coincidentemente la actividad de la PLD de los ROS fue inhibida en un 45% en LROS con respecto a los valores de actividad presentes en DROS. La actividad de la PLD en DROS tratados con toxina C3 disminuyó significativamente alcanzando los mismos valores que en LROS. No se detectaron cambios en la actividad de la enzima en presencia de toxina pertussis. Análisis de Western Blot demostraron la presencia de la isoforma PLD1 en estas membranas. Nuestros resultados nos permiten concluir que la localización de RhoA en los segmentos externos es dependiente de la luz y que esta proteína G monomérica participa en el mecanismo de regulación de la PLD de los ROS.

511. (7977) EFECTO DE PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE ACIL-COA TIOETERASA I MITOCONDRIAL EN GLÁNDULA ADRENAL. DUARTE, ALEJANDRA; MALOBERTI, PAULA; CASTILLA, ROCÍO; CASTILLO, FERNANDA; NEUMAN, ISABEL; PODESTÁ, ERNESTO J.

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

Los proliferadores de peroxisomas (PP) son compuestos químicos farmacéuticos (drogas hipolipemiantes, plastificantes como el di(2-etilhexil)ftalato (DEPH), etc.) que actúan por unión a receptores nucleares específicos, los PPAR. En hígado producen aumento en la expresión de acil-CoA tioesterasas de ácidos grasos de cadena larga. En células de Leydig, provocan disminución en la síntesis de testosterona al inhibir el Receptor Periférico de Benzodiazepinas (PBR) que participa en el transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial. Poco se sabe del efecto de estos compuestos sobre el funcionamiento de la glándula adrenal. En nuestro laboratorio determinamos que la acil-CoA tioesterasa mitocondrial I (MTE-I) cumple un papel importante en la regulación de la esteroideogénesis actuando en la misma vía que el PBR. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del tratamiento de ratas con PP sobre la expresión de MTE-I en células adrenales, y sobre la síntesis de esteroides. Como está descrito, el tratamiento de ratas con DEHP redujo los niveles de testosterona y aumentó los niveles de MTE-I hepática. Se observó una disminución de los niveles de expresión de MTE-I en células adrenales tratadas con PP y analizadas por northern y western-blot. Estos resultados se confirmaron por el tratamiento de células tumorales adrenocorticales Y1 con un agonista de PPAR α (WY-14643). Este compuesto produjo en células Y1, una inhibición dosis-dependiente de la esteroideogénesis (82 \pm 3; 59 \pm 7; 62 \pm 3 ng de progesterona/ml, para célu-

las estimuladas con ACTH en ausencia o presencia de 100 y 200 μ M WY respectivamente) y disminución en los niveles de MTE-I. En conclusión, los PP actúan en forma diferencial en hígado y en glándula adrenal, provocando en esta última una disminución de la expresión de MTE-I lo que conlleva a una reducción en la síntesis de hormonas esteroideas.

512. (8024) GENERACIÓN DE DIACILGLICEROL A TRAVÉS DE LA ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA C- FOSFATIDILCOLINA ESPECÍFICA EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. MATEOS, MELINA; URANGA, ROMINA; SALVADOR, GABRIELA; PASQUARÉ, SUSANA; GIUSTO, NORMA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

Los diacilglicéridos (DAG) son componentes minoritarios de las membranas celulares con activa participación tanto en las propiedades fisicoquímicas de las membranas como en la activación de diversas vías de transducción de señal. DAGs de una determinada composición de ácidos grasos pueden ser generados a partir de la hidrólisis de distintos fosfolípidos. La fosfolipasa C-específica para fosfatidilcolina (PC-PLC), participa en distintos eventos intracelulares como respuesta a factores de crecimiento, proliferación y muerte celular. Nuestro objetivo fue el estudio y la caracterización de la actividad de la PC-PLC en membranas sinaptosomales de corteza cerebral de rata. En nuestro sistema experimental pudimos determinar por primera vez la actividad de una enzima capaz de hidrolizar PC y generar DAGs. La caracterización de la enzima demostró que tiene un pH óptimo alrededor de 7, y que es inhibida por la presencia de concentraciones milimolares de Calcio. Ensayos con agentes tensioactivos como el Tritón-X-100 y el Deoxicolato de Sodio estimularon la actividad de la enzima. Para determinar la localización de la PC-PLC, los sinaptosomas se lisaron y se aisló la membrana plasmática (SPM) proveniente de los mismos. La actividad de PC-PLC permaneció mayoritariamente en la fracción SPM, demostrando que la PC-PLC es una proteína de membrana. Nuestros resultados demuestran la presencia de una nueva vía de generación de DAGs a partir de fosfatidilcolina en sinaptosomas de corteza cerebral de rata.

513. (8052) METABOLIZACIÓN DE DIACILGLICEROL (DAG) EXÓGENO EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL (CC) DE RATA. EMPLEO DE DETERGENTES, CALCIO Y ACTIVADORES DE FOSFORILACIÓN. ZULIAN, SANDRA; ILINCHETA BOSCHERO, MÓNICA; GIUSTO, NORMA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), Bahía Blanca, Argentina.

El diacilglicerol (DAG) y el ácido fosfatídico (PA) son reconocidos mensajeros lipídicos participantes de numerosas cascadas de señalización. Una enzima que participa en la remoción de DAG y generación de PA es la DAG quinasa (DAGQ). Esta enzima es usualmente ensayada con octilglucósido (OG) 50-75 mM. Sin embargo, nuestras experiencias con OG indicaban que en sinaptosomas de CC la formación de monoacilglicerol (MAG) era predominante. El objetivo de este trabajo fue realizar el análisis comparativo de las actividades sinaptosomales implicadas en la metabolización del DAG para la formación de PA y MAG. Se emplearon OG, TritonX100, deoxicolato de sodio (DNa) y dimetil sulfóxido (DMSO). Se determinó la metabolización de DAG saturado e insaturado (0,2 μ M a 1 M de DAG). Se evaluaron calcio, PDBU, staurosporina y o-vanadato. Con TX100 el PA sintetizado representa 479% respecto a su formación usando micelas de OG. Con DNa este valor fue de 177%. La relación PA/MAG es de 0,19 con OG, 0,8 en TX100 y 1,5 en DMSO. Con este último se advierte hasta un 80 % de formación de Glicerol. Ambas vías (quinásica y lipásica) utilizan activamente y hasta 1 M al DAG di-16:0. EGTA estimuló a la DAGQ y el Ca $^{++}$ (5 mM) la inhibió. PDBU inhibió la formación de PA y MAG. El o-vanadato estimuló a la DAGQ e inhibió la formación de MAG y Glicerol. 1)

Las actividades enzimáticas muestran una elevada capacidad para la remoción del DAGe, sin selectividad en la composición del sustrato. 2) La inhibición de DAGQ por calcio y PDBU, y la reversión por EGTA y staurosporina, permite sugerir que la fosforilación por PKC modula negativamente a la enzima. 3) La activación de DAGQ por o-vanadato y la inhibición de la vía lipásica indican una regulación bidireccional 4) El orden de preferencia deterativa para ofertar DAGe a la DAGQ sinaptosomal sería TX100 ó DMSO > OG > DNa. Para la actividad lipásica (DAGL) sería OG el mas efectivo, mientras que en DMSO se favorece la formación de Glicerol.

514. (8076) ACCIÓN DE INSULINA SOBRE LA METABOLIZACIÓN DE DIACILGLICEROL (DAG) EXÓGENO EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL (CC) DE RATAS ADULTAS Y SENILES. ILINCHETA DE BOSCHER, MÓNICA; ZULIAN, SANDRA; GIUSTO, NORMA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), Bahía Blanca, Argentina.

El mantenimiento de los niveles de diacilglicerol (DAG) en las células es un evento estrictamente controlado. Una de las enzimas participantes en este control es la DAG quinasa (DAGQ), quien a través de la síntesis de ácido fosfatídico (PA) a expensas de DAG y ATP, remueve al segundo mensajero DAG y promueve la formación de otro mensajero lipídico, el PA. Hemos reportado que en la edad avanzada (28 m) los sinaptosomas de CC presentan una mayor actividad basal de PLD y PAP2 mientras que la DAGQ está inhibida sugiriendo una mayor «disponibilidad» de DAG. A su vez y en condiciones de estímulo de PLD por Insulina y o-vanadato, observamos en adultos el estímulo de DAGQ y la disminución de esta respuesta en animales seniles (SAN2003). Dado el tipo de ensayo (micelas mixtas de detergente-[³H]DAG (0,2 mM)) era necesario evaluar la formación de monoacilglicerol (MAG) y glicerol (G) como vías alternativas de transformación de DAGe. Para ello y dada la cinética rápida de la DAGQ, realizamos experiencias a 30°C y 37°C en presencia o ausencia de Insulina y o-vanadato. Se observó que en sinaptosomas de CC de adultos y a 30°C el sustrato es ávidamente utilizado por la DAGQ, representando a los 2 min de incubación el 54% de los productos formados seguido de MAG (27%) y Glicerol (17%). En 30 min de incubación la formación de Glicerol alcanza el 66% del total utilizado. En animales seniles y en condición basal, se inhibe la síntesis de PA y la de MAG+G. A 37° se inhibe la DAGQ y la formación de Glicerol a tiempos tempranos (5 min). En adultos la Insulina incrementa fuertemente la relación PA/MAG+G. El efecto de Insulina no está presente en animales seniles. 1) La acción de Insulina en sinaptosomas de CC de ratas adultas favorece la transformación hacia PA en desmedro de la utilización hacia glicerol 2) En el envejecimiento: a) estarían disminuidos ambos mecanismos de transformación del DAG exógeno (DAGQ y la vía de DAGL/MAGL) b) la acción de Insulina sobre ambas vías está ausente.

**TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 2:
EN PROCESOS PATOLÓGICOS**

515. (6763) REGULACIÓN GÉNICA DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL (mtNOS) Y SU RELACIÓN CON LA NITRACIÓN DEL COMPLEJO I EN EL HIPOTIROIDISMO. FRANCO, MARÍA CLARA; PERALTA, JORGE G.; ANTICO ARCIUCH, VALERIA G.; PODEROSO, JUAN JOSÉ; CARRERAS, MARÍA CECILIA

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

Las variaciones del estado tiroideo son seguidas por cambios en la actividad mitocondrial y en el consumo de oxígeno. Previamente, observamos en el hipotiroidismo un aumento de la expresión de NOS neuronal (nNOS), su translocación a mitocondria

(mtNOS), nitración de proteínas mitocondriales y activación diferencial de MAPKs. Con el propósito de modular experimentalmente los efectos de mtNOS, ratas Wistar machos fueron divididas en 4 grupos, cada uno con n=4-8: control (C), hipotiroideo (Hipo) (metimazol 0.02%, 4 sem, vía oral), Hipo + L-NAME (Hipo + 0.75 mg L-NAME/ml, 3 sem, vía oral) e Hipo + T3 (hipotiroideas + 15 µg T3/kg peso/día, IP por 3 días). El consumo de oxígeno sistémico disminuyó en Hipo pero fue reestablecido por T3 o L-NAME (ml/kg(0.75).min) (C: 16.0 ± 0.1; Hipo: 11.0 ± 0.4*; Hipo + L-NAME: 14.9 ± 0.5*, Hipo + T3: 17.8 ± 0.2; *p<0.05). En hipotiroidismo se apreció un aumento de la transcripción de nNOS alfa. En esta condición, la nitración de proteínas mitocondriales fue evidente en el Complejo I (por Blue Native PAGE), que además exhibió una disminución de 62% en su actividad; L-NAME previno la disminución de la captación sistémica de O₂ y la nitración del Complejo I y preservó su función, sin modificar la expresión de mtNOS. La co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti-subunidad de 39 kDa del complejo I, seguida de western blot revelado con anticuerpos específicos anti-nNOS mostró la asociación entre estas dos proteínas. Las conclusiones son: a) El aumento de la transcripción y traslocación de nNOS (mtNOS) en el hipotiroidismo conduce a un aumento en la nitración de proteínas del complejo I, por la formación de peroxinitrito b) existe una asociación de mtNOS a proteínas del Complejo I que favorece sus efectos; c) además de sus efectos vasculares, L-NAME puede atenuar los efectos de mtNOS sobre el metabolismo oxidativo.

516. (6845) LA TRANSLOCACIÓN MITOCONDRIAL DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE ES RESPONSABLE DEL DAÑO MITOCONDRIAL HEPÁTICO EN LA ENDOTOXEMIA. FRANCO, MARÍA CLARA; ANTICO ARCIUCH, VALERIA; HOLOD, SILVIA ; FINOCCHIETTO, PAOLA; PODEROSO, JUAN JOSÉ; CARRERAS, MARÍA CECILIA

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

La sepsis es una entidad prevalente debida a respuesta inflamatoria generalizada inducida por infección severa y/o endotoxemia; el óxido nítrico (NO) es uno de los mediadores endógenos que aumenta marcadamente por expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La disfunción mitocondrial participa en la sepsis y en la aparición de estrés oxidativo y nitrosativo. El objetivo fue analizar la translocación de iNOS a mitocondrias en la endotoxemia y su contribución al estrés nitrosativo mitocondrial. Ratas Wistar machos fueron inoculadas i.p. con 10 mg LPS (*E. coli*)/kg peso y las mitocondrias hepáticas fueron aisladas y purificadas entre 2 y 24 h post-tratamiento. El ARNm de iNOS y la proteína citosólica se observaron a partir de las 2 h, con pico máximo entre 4-6 h; entre 6 y 12 h, iNOS fue detectada en mitocondrias por western blot e inmunomicroscopía electrónica y se asoció a nitración de proteínas y menor actividad de Complejo I (-70 %, p<.05). El fraccionamiento submitocondrial demostró máxima localización en espacio intermembrana y membrana externa, mientras que mtNOS constitutiva estaba enriquecida en membrana interna. Entre 12-24 h, iNOS desapareció de las mitocondrias; en este período, la hemoxigenasa-1 aumentó 10 veces en las organelas, en paralelo con activación máxima de Akt que estimula la biogénesis mitocondrial. La nitración de proteínas y la disminución selectiva de la actividad del complejo I revirtieron a las 24 h. En conclusión: a) en la endotoxemia, el aumento en la expresión hepática de iNOS es seguido por su translocación a las mitocondrias; b) en esta condición, el daño mitocondrial sería principalmente debido a iNOS translocada, c) una vez que iNOS es degradada por enzimas catabólicas específicas inducidas y translocadas a la mitocondria, como hemoxigenasa-1, la nitración en tirosina y la disfunción mitocondrial serían corregidas por mecanismos de desnitración y biogénesis mitocondrial.

517. (6976) EFECTOS DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA Prolongada EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA Y

LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES DE LA CEPA AMES. ARGENTINO, DP; DOMINICI, FP; MUÑOZ, MC; GIANI, J; TURYN, D

IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Existe una gran cantidad de evidencia que indica que el envejecimiento y la longevidad están en parte bajo control genético. La anulación de la expresión de proteínas que intervienen en sistemas de transducción de señales de proteínas homólogas a la insulina en invertebrados originan una marcada extensión de la vida. La restricción calórica (RC) es la única intervención ambiental que prolonga la duración de la vida. Los ratones de la cepa Ames (Prop1df/ Prop1df) representan un modelo de longevidad extendida en mamíferos bien establecido. Como resultado de una mutación en el gen Prop1, exhiben una deficiencia primaria de hormona de crecimiento, prolactina y tirotrófina, junto con una deficiencia secundaria de IGF-1 e hipersensibilidad a la insulina. La RC y la mutación Prop1 presentan efectos aditivos en la duración de la vida. Para estudiar el mecanismo detrás de este efecto, se realizó un análisis del estado de la vía de señalización de insulina in vivo llevado a cabo en el músculo esquelético de dichos animales alimentados ad libitum o sujetos a RC durante alrededor de un año. Además se evaluaron los efectos de la RC sobre los niveles circulantes de glucosa, insulina y sobre la masa corporal. En los ratones normales, la RC indujo una reducción en los niveles de insulina y glucosa junto con un incremento en la fosforilación del IRS-1 estimulada por insulina y en los niveles de GLUT-4. En contraste, la RC no modifica ninguno de estos parámetros en los ratones de la cepa Ames. Interesantemente, la RC redujo la abundancia relativa de la subunidad catalítica de la enzima fosfatidilinositol-3 fosfato quinasa en el músculo esquelético de ambos grupos de animales. Los presentes resultados sugieren que en el músculo esquelético la RC prolongada induce diferentes efectos en la homeostasis de la glucosa y en los primeros pasos del sistema de señalización de insulina en ratones normales y en ratones de la cepa Ames.

518. (6980) EFECTOS DE 20 DÍAS DE RESTRICCIÓN CALÓRICA EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA QUE LLEVA A LA ACTIVACIÓN DE AKT EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES LONGEVOS DE LA CEPA AMES MUÑOZ, MC; ARGENTINO, DP; DOMINICI, FP; GIANI, J; TURYN, D

IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

A la fecha existen siete modelos murinos con alteraciones genéticas que extienden la vida. Los ratones de la cepa Ames (Prop1df/Prop1df) son los mejor caracterizados. Presentan una mutación espontánea en el gen Prop1 que origina una deficiencia primaria de hormona de crecimiento, prolactina, tirotrófina y una deficiencia secundaria de IGF-1. Estas características van acompañadas de una disminución en la masa corporal, un marcado aumento en la sensibilidad a la insulina y una extensión en la duración de su vida en un 50%. Además, la restricción calórica (RC) es la única intervención ambiental que puede extender la duración de la vida en numerosas especies animales incluyendo mamíferos. Dicho tratamiento se asocia a un aumento de la sensibilidad de insulina. Recientemente se demostró que la RC extiende aún más la vida de los ratones Prop1df/Prop1df, pero los mecanismos detrás de dicho fenómeno no se conocen. Para determinar si dicho efecto aditivo se basa en un aumento de la sensibilidad a insulina a consecuencia de una regulación positiva de la transducción de la señal de insulina, se sometió a los ratones Prop1df/Prop1df a RC (70% de las calorías ingeridas ad libitum) durante 20 días. Posteriormente, se analizó la transducción de dicha señal in vivo en músculo soleus de estos animales. La RC disminuyó la glucemia y la insulinemia en los ratones controles pero no modificó dichos parámetros en los ratones Prop1df/Prop1df. Luego de la RC no se detectaron cambios en el sendero de señalización de insulina que lleva a la activación de la enzima Akt (fundamental en las acciones de esta hormona en el metabolismo de la glucosa) ni en los ratones contro-

les ni en los Prop1df/Prop1df. La RC por corto tiempo aumenta la sensibilidad a la insulina en ratones normales por un mecanismo independiente de la activación de las enzimas PI3K y Akt. El mismo tratamiento no modifica la sensibilidad a la insulina en los ratones Prop1df/Prop1df.

519. (7057) TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN RATONES ENANOS DE LA CEPA AMES. MIQUET, JOHANNA GABRIELA; SOTELO, ANA; TURYN, DANIEL

Depto. Química Biológica-IQUIFIB, UBA

Los ratones enanos de la cepa Ames se caracterizan por una deficiencia hipofisaria primaria que consiste en la ausencia, o reducción extrema, de las células de la hipófisis anterior que producen hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL) y tirotrófina (TSH). En el presente trabajo, se utilizaron los ratones enanos de la cepa Ames como modelo para investigar la influencia de la deficiencia de GH desde el nacimiento en la transducción de la señal de GH in vivo. Se evaluó mediante inmunoprecipitación y Western-blot la principal vía de señalización activada por GH, la vía JAK2/STAT5, y su regulación por las proteínas supresoras de la señal de citoquinas SOCS/CIS en ratones enanos y normales de la cepa Ames. El contenido proteico del receptor de GH (GHR), la quinasa JAK2 y los transductores de la señal y activadores de la transcripción STAT5a y STAT5b no fue significativamente distinto entre ratones enanos y normales. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles basales de fosforilación de la vía JAK2/STAT5. Luego de un estímulo con GH, la fosforilación de JAK2, STAT5a y STAT5b aumentó significativamente y en una medida similar tanto en los ratones normales como los enanos. El contenido proteico de CIS, un supresor que compete con STAT5 por su unión al receptor, es un 80% menor en los ratones enanos ($P < 0,001$), indicando que esta proteína está regulada por los niveles de GH in vivo. Sin embargo, SOCS-2 y SOCS-3 no varían significativamente entre los ratones normales y enanos. En conclusión, el contenido proteico de CIS es menor en los ratones enanos Ames, hecho que indicaría que la expresión de esta proteína está regulada por GH in vivo. Sin embargo, la vía de transducción de la señal de GH JAK2/STAT5 no se encuentra alterada en estos ratones, lo que sugiere que la disminución de la concentración de CIS no se asociaría con hipersensibilidad a la hormona de crecimiento en estas condiciones.

520. (7084) VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INDUCIDAS POR EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF) EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO T47D. RIVAS, MARTÍN; ROSEMBLIT, CINTHIA; CARNEVALE, ROMINA; PROIETTI, CECILIA; SALATINO, MARIANA; CHARREAU, EDUARDO; ELIZALDE, PATRICIA V; SCHILLACI, ROXANA

Instituto de Biología y Medicina Experimental

En ciertos tumores de mama el TNF promueve la progresión del ciclo celular. Previamente demostramos que el TNF favorece la proliferación de células C4HD, provenientes de un carcinoma mamario murino progestágeno-dependiente, a través de la activación de las vías de señalización ERK1/2 y PI3K/Akt, pero independientemente de la vía de p38. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las vías de señalización activadas por TNF pero, en este caso, en la línea de carcinoma mamario humano T47D y su relación con la proliferación celular. Para determinar el nivel de activación de cada vía realizamos ensayos de Western blot, utilizando anticuerpos específicos contra la forma fosforilada de cada quinasa involucrada, en extractos de células T47D estimuladas entre 0-60 min con TNF 20 ng/ml. Se observó una fuerte activación de la vía de ERK1/2 (11.4 ± 4.5 veces) y una moderada activación de la vía PI3K/Akt (3.5 ± 1.1 veces) a los 15 min de estimulación con TNF siendo este efecto transiente. En cambio, no se observó activación de la vía de p38. Al analizar la proliferación celular, determinada a las 24 h por incorporación

de timidina-³H, observamos que el TNF indujo un incremento de $40 \pm 5\%$ ($P < 0.001$) con respecto a los controles. Dicha proliferación fue inhibida significativamente por el pretratamiento con PD98059 (20 μ M), inhibidor de la vía ERK1/2, y por LY294002 (4 μ M), inhibidor de PI3K. Nuestros resultados sugieren que el TNF induce la proliferación de carcinomas mamarios, tanto murino como humano, a través de un patrón común de vías de señalización que involucra la activación de las vías de ERK1/2 y PI3K/Akt pero no de la vía de p38.

521. (7601) MECANISMO DE ACCIÓN DEL HEXACLO-ROBENCENO SOBRE EL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS Y LA ACTIVIDAD DE LA SRC QUINASA EN HÍGADO DE RATA. RANDI, ANDREA SILVANA; CARBONE, VERÓNICA ; CARDOZO, JULIÁN; KOLLIKER FRERS, RODOLFO; KLEIMAN, DIANA

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

El Hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado de alta persistencia en el ambiente, detectándose en alimentos y tejidos humanos. Como tóxico «tipo dioxina» se une al Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (RHA) citosólico, un factor de transcripción formando complejos con la Src-quinasa. La unión al RHA provocaría que: 1) la Src-quinasa active receptores de factores de crecimiento y 2) el complejo tóxico-RHA se transloque al núcleo. Recientemente demostramos que el HCB produce un aumento de la actividad del Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico e incrementa los niveles de c-Fos, c-Jun y c-Myc. Objetivo: estudiar si el tratamiento in vivo con HCB en función del tiempo y de la dosis afectaba: a) los niveles de RHA citosólico y su translocación al núcleo; b) las cantidades de Src quinasa y su actividad. Ratas intoxicadas con HCB a diferentes dosis (0; 1; 10 y 100 mg/kg p.c.) durante 30 días; y tiempos (0; 12 hs, 24hs, 10 y 30 días) con HCB (1 mg/kg p.c.), se usaron para determinar niveles de RHA y Src-quinasa desde citosoles, microsomas y proteínas nucleares hepáticos mediante inmunoprecipitación e inmunoblot, y la actividad por ensayo de quinasa de inmunocomplejos con sustrato RR-SRC. Resultados: a) Curva de dosis: el HCB indujo translocación de los RHA desde el citosol (HCB[1]:63%; $p < 0.001$) al núcleo (HCB[1]:153%; $p < 0.05$) y aumentó la actividad de Src desde 10mg/kg (C:0,08 \pm 0,02; HCB[1]0:0,26 \pm 0,07pmol/min.mg; $p < 0.05$). b) Curva de tiempo: el HCB incrementó los niveles de RHA citosólicos a las 12hs (HCB[12hs]:400%; $p < 0.001$) y nucleares a 24hs y 10 días (HCB[24hs]:95% y HCB[10d]:80%; $p < 0.05$) y aumentó la actividad de Src-quinasa desde las 24hs (C:0,13 \pm 0,01y HCB[24hs]:0,37 \pm 0,07pmol/min.mg; $p < 0.01$). El HCB induce la translocación del RHA hacia el núcleo y aumenta la actividad de Src desde las 24 horas de tratamiento. El presente trabajo muestra por primera vez, dos eventos fundamentales en el mecanismo de acción de este tóxico ambiental.

522. (7719) EL HIERRO (FE3+) Y LA HOLOTRANSFERRINA (HOLOTF) PROMUEVEN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN. SALIS, CAROLINA; DAVIO, CARLOS (1); SOTO, EDUARDO; PASQUINI, JUANA; SETTON DE AVRUJ, PATRICIA

Depto. Quím. Biol., Fac. Farm. y Bioq., IQUIFIB, UBA-CONICET; (1) LABORATORIO DE RADIOISOTOPOS, F.F.y B., UBA

La diferenciación de las células de Schwann (CS) formadoras de mielina se completa con la aparición de proteínas de mielina, P0 y MBP, y la concomitante disminución de marcadores de CS inmaduras o no formadoras de mielina como GFAP y p75NTR. Hemos demostrado previamente que la holoTf es capaz de prevenir la desdiferenciación de las CSs en cultivo promovida por la privación de suero (Salis y col. 2002), mientras que la apoTf fue incapaz de producir dicho efecto. Con el objeto de investigar porqué la holoTf tiene ese papel en la diferenciación de las CSs y la apoTf no, se evaluó el efecto prodiferenciador de varias concentraciones de Fe3+ (50-200 ng Fe3+/ml) en la forma de citrato

de amonio férrico, midiendo los niveles de MBP, P0, p75NTR y c-myc por inmunocitoquímica y Western blot. También se midieron los niveles de AMPc, CREB y p-CREB. El tratamiento de las CS con 70 y 90 ng/ml de Fe3+ produjo una disminución en los niveles de c-myc y de p75NTR de aproximadamente 40% y 35%, respectivamente. Resultados similares fueron observados en CS en cultivo tratadas con holoTf. El aumento de los niveles de marcadores de CS formadoras de mielina como MBP y P0, también se observó en presencia de 70 y 90 ng Fe3+/ml. Cabe destacar que 70 ng Fe3+/ml corresponde a la concentración de Fe3+ que aporta la holoTf en las concentraciones utilizadas (100 μ g/ml). Estímulos tanto con holoTf como con Fe3+ en las concentraciones que promueven la diferenciación, indujeron incremento significativo en los niveles intracelulares de AMPc, dicho estímulo resultó bloqueado por la presencia de deferroxamina, un quelante de hierro. En esas mismas condiciones la holoTf y el Fe3+ promovieron la fosforilación del CREB. El efecto prodiferenciador de la holoTf y el Fe3+ fue inhibido por el agregado de un inhibidor de PKA. Estos resultados sugerirían que el Fe3+ en su forma libre o conjugado con Tf puede ejercer un papel importante en la maduración de las CSs, modulando la vía del AMPc.

523. (7909) PRESENCIA DE LA VÍA DE LA FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASA EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. EFECTOS DEL INSULTO OXIDATIVO. URANGA, ROMINA; MATEOS, MELINA; GIUSTO, NORMA; SALVADOR, GABRIELA

Instituto de investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

Muchos de los eventos de transducción de señal que regulan la plasticidad neuronal y la supervivencia en sistema nervioso central, se encuentran concentrados en las sinapsis. Asimismo se ha comprobado que defectos en las vías de señalización sináptica, inducidos por stress oxidativo, están implicados en algunas enfermedades neurodegenerativas y que la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) participa activamente en estos eventos. El objetivo de nuestro trabajo fue identificar componentes de la vía de la PI3K en sinaptosomas de corteza cerebral de rata. Para ello trabajamos con sinaptosomas metabólicamente activos y con sinaptosomas expuestos a condiciones de stress oxidativo, inducido por FeSO4 a distintos tiempos de incubación. Estudios de Western Blot utilizando anticuerpos dirigidos contra la subunidad reguladora p85a de la PI3K nos permitieron identificar una proteína de aproximadamente 90 kDa de PM en sinaptosomas metabólicamente activos. Del mismo modo, pudimos determinar la presencia de la quinasa AKT en este sistema. Cuando los sinaptosomas fueron expuestos al insulto oxidativo la incorporación de glutamato disminuyó significativamente con respecto a los controles. Asimismo, la presencia de FeSO4, incrementó los niveles de proteínas fosforiladas en tirosina. Nuestros resultados demuestran la presencia de la vía PI3K/AKT en terminales sinápticas aisladas. Además podemos concluir que bajo stress oxidativo disminuye la capacidad de transporte de glutamato y se incrementa la actividad de tirosina quinasa en sinaptosomas de corteza cerebral.

524. (7927) LA INDUCCIÓN DE LA MAP QUINASA FOSFATASA-1 CONTRIBUYE A LA INACTIVACIÓN DE ERK1/2 Y JNK LUEGO DEL ESTRÉS POR CALOR EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS. GOROSTIZAGA, ALEJANDRA; BRION, LAURA; MALOBERTI, PAULA; CORNEJO MACIEL, FABIANA; PODESTÁ, ERNESTO J.; PAZ, CRISTINA

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

En células esteroideogénicas un aumento moderado de temperatura inhibe la síntesis de esteroides en grado variable según el tipo celular. Dado que los eventos moleculares disparados por el estrés por calor no fueron descriptos, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la cascada de señalización inducida por shock térmico (ST, 10 min, 45(0)C) en células de Leydig

MA-10 y adrenocorticales Y1. El análisis por Western blot de las formas fosforiladas de ERK1/2 y JNK reveló que el ST promueve la activación rápida y transitoria de ambas quinasas en los dos tipos celulares. La MAP quinasa fosfatasa 1 (MKP-1) es una enzima de actividad dual involucrada en la inactivación de las MAP quinasas (MAPK). Dado que MKP-1 es inducida en respuesta a diversos estímulos, analizamos el efecto del ST sobre su expresión. En células MA-10, el análisis por Western blot evidenció un aumento transitorio en los niveles de la proteína luego del ST (3 veces, 30 min). Mediante Northern blot se determinó que el ST incrementa los niveles del ARNm de MKP-1. Este efecto es significativo a los 15 min, alcanza un máximo (3 veces) a los 60 min y disminuye posteriormente. Similares resultados se observaron en las células Y1. Comparando la cinética de inducción de MKP-1 y la fosfo-desfosforilación de las MAPK, se infiere que la inducción de MKP-1 podría contribuir a la inactivación de ERK1/2 y JNK luego del ST. Otro evento producido en ambos tipos celulares como respuesta al ST fue el incremento notorio de los niveles de la proteína HSP72 luego de 5-6 h de ocurrido el estrés por calor, indicando un aumento de la protección celular. Se concluye que en células de Leydig y adrenocorticales el ST promueve la activación de MAPKs relacionadas tanto con la sobrevida (ERK1/2) como con la muerte celular (JNK) e incluso la inducción de una enzima capaz de inactivar a ambas quinasas, MKP-1 y de una proteína relacionada con la reparación del daño, HSP72.

BIOLOGÍA CELULAR 3

- 525. (6871) CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UNA SECUENCIA INVOLUCRADA EN LA ACUMULACIÓN NUCLEAR DE LA FOSFATASA DE TIROSINA PTP1B.** GARCÍA, NORA SILVINA; HERNÁNDEZ, MARIANA V.; DAVIS SALA, GEORGINA; ARREGUI, CARLOS O.

IIB-INTECH

La PTP1B se ancla a la cara citoplasmática del retículo endoplásmico mediante una secuencia C-terminal de ~35 amino-ácidos. Esta secuencia puede ser removida por calpaínas, produciendo una forma soluble truncada en el C-terminal. Nosotros analizamos la localización subcelular de la forma truncada de la PTP1B de pollo fusionada a la GFP (GFP-PTP1Bt). Observamos que la GFP-PTP1Bt se acumula en el núcleo en un 50% de la población de células. Con el propósito de identificar la región involucrada en la acumulación nuclear de la PTP1Bt empleamos una estrategia mutacional basada en PCR. En una primera instancia deletionamos las regiones N- y C-terminal flanqueantes al dominio catalítico de la PTP1Bt. Solo la delección de la región C-terminal bloquea completamente la acumulación nuclear de la proteína. A partir de estos resultados realizamos nuevas rondas de delecciones terminales hasta que identificamos una región mínima involucrada en la acumulación nuclear de ~20 aminoácidos. Esta región es rica en residuos ácidos y en su mitad C-terminal posee secuencias consenso de fosforilación de PKA, CKI y CKII. Como es esperable, una delección interna de la PTP1Bt que remueve solamente estos 20 aminoácidos anula completamente su acumulación nuclear. Mutaciones puntuales que anulan los sitios de fosforilación disminuyen el porcentaje de células con PTP1B acumulada en el núcleo a un 35%. Resultados similares se observan cuando se deleciona la secuencia (12 aminoácidos) que contiene específicamente todos los sitios de fosforilación. La región de 20 aminoácidos identificada en la PTP1B de pollo no está conservada en su homóloga humana, la cual, interesantemente, no se acumula en el núcleo. Nuestros resultados sugieren que la PTP1B pasa por un estadio de localización nuclear, probablemente asociado al ciclo celular, y para ello depende de una secuencia ~20 residuos del C-terminal. La fosforilación contribuye solo en parte a esta localización. Trabajo financiado por ANPCyT, PICT 01-08039.

- 526. (7133) EL TALIO ESTIMULA LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN CÉLULAS DE**

FEOCROMOCITOMA DE RATA (PC12). HANZEL, CECILIA E.; VERSTRAETEN, SANDRA V.

Dep. Química Biológica, IQUIFIB (UBA-CONICET), Fac. Farmacia y Bioquímica, Univ. Buenos Aires.

El talio (Tl) es un metal pesado muy utilizado en la industria. Este metal posee dos estados de oxidación: Tl(+) y Tl(3+). La acumulación de Tl(+) en el cerebro causa neurodegeneración, desmielinización y acumulación de productos de la oxidación lipídica, entre otros efectos. El objetivo de este trabajo fue investigar si el Tl(+) y/o Tl(3+) alteran la producción de especies reactivas del oxígeno, utilizando como modelo células indiferenciadas de feocromocitoma de rata (PC12). Con este fin se incubaron PC12 (1-72 hs) en presencia de Tl(+) o Tl(3+) (10-250 μ M). La viabilidad celular se evaluó midiendo la reducción del MTT. Los productos del estrés oxidativo intra y extracelulares se cuantificaron midiendo la oxidación de la sonda fluorescente dicarboxidiclorodihidrofluoresceína y la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, respectivamente. El contenido de H₂O₂ intracelular se determinó midiendo la oxidación de la sonda fluorescente dihidrorodamina 123. La viabilidad celular disminuyó progresivamente en función de la concentración de Tl(+) y Tl(3+). El contenido de los productos de oxidación intracelulares aumentó en una forma dependiente del tiempo de incubación y de la concentración del metal, y se correlacionó con la liberación de los mismos al medio extracelular. Finalmente, se observó un aumento en el contenido de H₂O₂ intracelular. En todos los casos, la magnitud de los efectos observados para el Tl(3+) fue mayor que los obtenidos con Tl(+). Nuestros resultados sugieren que el Tl(+) y Tl(3+) estimulan la producción de especies reactivas del oxígeno, las cuales serían responsables del daño oxidativo a los componentes celulares y que podrían determinar una menor viabilidad celular. Proyecto subsidiado por la Univ. de Buenos Aires (B072) y ANPCyT (PICT 12285).

- 527. (7162) ESTUDIO DEL MANEJO DE UNA SOBRECARGA DE NA(+) EN VESÍCULAS DE RIBETE EN CEPILLO DE TÚBULO PROXIMAL: EFECTO DE LA UNINEFRECTOMÍA.** DAMASCO, MARÍA CRISTINA; AMORENA, CARLOS (2); MAC LAUGHLIN, MYRIAM (3)

PRHOM. CONICET. FCEyN. UBA; ECyT. UNSAM (2); ININCA, Fac. Med. UBA (3)

Hemos demostrado, utilizando técnica de clearance, que ratas uninefrectomizadas (UNx) presentan una capacidad disminuida para eliminar una sobrecarga de Na(+). Posteriormente corroboramos estos resultados utilizando técnica de micropunción tubular proximal y evaluando el flujo de HC03(-). Demostramos que durante la expansión salina este segmento tubular de las ratas UNx no presenta disminución de este flujo a diferencia del grupo control 2 riñones (2R). En el presente trabajo utilizamos una técnica «in vitro» que permite independizarse de factores endógenos. Nuestro objetivo fue estudiar en vesículas de ribete en cepillo de túbulo proximal de ratas 2R y UNx la cinética del transportador Na(+)/H(+) en un subgrupo en estado basal y en otro después de la expansión al 5% del peso corporal con Ringer HCO₃(-). Al finalizar el experimento los riñones eran lavados, extraídos y las cortezas utilizadas para la preparación de vesículas de ribete en cepillo del túbulo proximal por centrifugación diferencial utilizando el método del Calcio. La cinética del intercambiador se evaluó por fluorometría. Los resultados de V_{max} (velocidad máxima) en UF/min (UF: unidades fluorométricas) fueron los siguientes: Grupo 2R : s/expansión 26997 \pm 2102 (n=4), c/expansión 11186 \pm 410 (n=5) (p<0.05). Grupo UNx: s/expansión 23297 \pm 1536 (n=4), c/expansión 17050 \pm 745 (n=4) (p<0.05). Hubo además diferencias significativas entre los subgrupos expandidos 2R y UNx (p<0.05). Conclusión: coincidiendo con los resultados obtenidos «in vivo», cuando se estudia la cinética del intercambiador Na(+)/H(+) aislado de factores endógenos, se observa una disminución de la capacidad de manejar una sobrecarga de Na(+) en las ratas UNx en relación a las control 2R.

528. (7218) INFLUENCIA DE CAROTENOIDES SOBRE EL EFECTO LETAL INDUCIDO POR LA RADIACIÓN SOLAR EN BACTERIAS AMBIENTALES. OPPEZZO, OSCAR J.; PIZARRO, RAMON A.

CNEA. Departamento de Radiobiología

Datos bibliográficos sugieren que en bacterias no fotosintéticas los carotenoides actúan como fotoprotectores. Nuestro objetivo fue evaluar esta fotoprotección en bacterias ambientales pigmentadas, aisladas y caracterizadas en nuestro laboratorio. Los organismos estudiados se cultivaron en presencia y en ausencia de un inhibidor de la carotenogénesis. En ambas condiciones, se midió la disminución del número de células viables en suspensiones bacterianas expuestas a la radiación solar. Los carotenoides se extrajeron y se estudiaron por espectroscopía de absorción. En las especies estudiadas, el inhibidor redujo considerablemente el contenido de pigmentos sin impedir el crecimiento bacteriano. Durante las irradiaciones, el recuento de viables permaneció inicialmente constante para luego disminuir siguiendo aproximadamente una función exponencial. En *Micrococcus sedentarius*, *Micrococcus* sp, *Aeromonas* sp y *Citrobacter* sp la despigmentación no introdujo cambios apreciables en la sensibilidad a la luz solar. En otras dos especies de *Aeromonas* los efectos letales en las bacterias crecidas en presencia del inhibidor se manifestaron antes que en las bacterias control. En *Rhodococcus* sp la pérdida de la viabilidad se manifestó a los 60 min en las bacterias crecidas con inhibidor y a los 90 min en las pigmentadas, y luego se requirieron respectivamente 12 y 22 min de irradiación para reducir al 10% el número de células viables. Los resultados, comparados entre sí y con otros descriptos en la literatura, sugieren que en ausencia de fotosensibilizadores externos la eficacia de los carotenoides como fotoprotectores es muy variable, aun entre organismos que pertenecen al mismo género y sintetizan cromóforos semejantes. En este tipo de ensayos, la ausencia de fotoprotección ha sido atribuida con frecuencia al uso de fuentes artificiales de radiación. Nuestros resultados indican que entre los organismos estudiados esta característica parece frecuente aun exponiéndolos a la luz solar.

529. (7296) ACCION DEL ACIDO LINOLEICO CONJUGADO SOBRE LA PEROXIDACION LIPIDICA. PIERGACOMI, VIVIANA ANGELICA; PALACIOS, ALEJANDRO; CATALA, ANGEL

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

Acido Linoleico Conjugado (ALC) es un término genérico que describe mezclas de isómeros conjugados dienoicos del ácido linoleico. Varios isómeros se hallan en la grasa butirosa, el queso y en la carne de vaca. El ALC se produce en el rúmen de bovinos y otros rumiantes por la biohidrogenación microbiana de los ácidos linoleico y linoléico. Se estudió su rol en cáncer, función inmune, stress oxidativo, arteriosclerosis, metabolismo de ácidos grasos y lípidos, obesidad y diabetes. El efecto de los isómeros puros no está del todo claro. Varios autores asumieron que la forma activa es cis 9-trans11, ya que el ALC se ha obtenido como componente anticarcinogénico a partir de carne cocida, y en ésta el porcentaje del isómero cis 9-trans11 es de un 60-80% del mismo. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de dos isómeros del ALC: 9c,11t 90%-FFA y 10t,12c 90%-FFA, sobre la peroxidación lipídica de microsomas de hígado de rata, se trabajó con un lote de ratas Wistar AH/HOK de 6 semanas de vida. La peroxidación se realizó en un sistema in vitro, no enzimático, se cuantificó midiendo quimioluminiscencia (QL) durante 180 minutos y se analizó la composición de ácidos grasos (área %) en un cromatógrafo gas líquido. Analizando QL se observó que el daño peroxidativo disminuyó por la adición de ALC c9-t11 y ALC t10-c12, la emisión lumínica de los microsomas fue mas baja en el caso del isómero ALC t10-c12. Estudiando la composición de ácidos grasos nativos vs peroxidados, se observó disminución de los porcentajes de C18:3n-3 y C20:4n-6. Comparando microsomas peroxidados en presencia de ALC cis9-trans11

y trans10-cis12, se observó que el daño peroxidativo fue menor en el caso de los dos ácidos grasos mencionados, respecto a aquellos microsomas peroxidados en ausencia de ALC. El análisis de los resultados expuestos permite comprobar el efecto inhibidor que ejerce el ALC sobre la lipoperoxidación de microsomas de hígado in vitro, observándose que la inhibición fue mayor por acción del isómero trans10-cis12.

530. (7314) ESTUDIO COMPARATIVO DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA NO ENZIMÁTICA EN MITOCONDRIAS OBTENIDAS DE HÍGADO Y RIÑÓN DE RATA Y BOVINO. MARMUNTI, MONICA; GAVAZZA, MARIANA; CATALÁ, ANGEL

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

Mitocondrias son organelas celulares altamente expuestas al daño por radicales libres. Son ricas en ácidos grasos polinosaturados, principalmente ácido araquidónico (C20: 4 n6) y docosahexaenoico (22:6 n3), los cuales son susceptibles a la peroxidación lipídica. El objetivo de este trabajo fue determinar el nivel de la peroxidación lipídica no enzimática dependiente de ascorbato-Fe++ en mitocondrias aisladas a partir de hígado y riñón de rata y bovino. Para evaluar la lipoperoxidación se utilizaron dos marcadores: quimioluminiscencia (QL) (cpm totales/mg de proteína) y composición de ácidos grasos analizados por cromatografía gaseosa. El índice de insaturación (UI) fue utilizado para evaluar las alteraciones de los ácidos grasos observados durante el proceso. Observamos que las mitocondrias hepáticas y renales de ambas especies fueron afectadas por la peroxidación lipídica. Los valores de emisión lumínica fueron mayores en mitocondrias de hígado de rata (2918.92 ± 632.07) que en bovinos (1553.52 ± 325.06), mientras que no se observaron diferencias significativas en mitocondrias de riñón de ambas especies. El análisis de los ácidos grasos mostró que C20:4 n6 y C22:6 n3 fueron los más sensibles a la lipoperoxidación no enzimática en mitocondrias de hígado y riñón de ambas especies. El contenido de los ácidos grasos polinosaturados fue más bajo en mitocondrias de hígado bovino (15.78 ± 0.76) que en rata (43.11 ± 4.16). Consecuentemente el UI fue significativamente más bajo en bovino que en rata. El contenido de los ácidos grasos polinosaturados de mitocondrias renales, no mostró diferencias significativas entre ambas especies, presentándose el UI no significativo. Los resultados sugieren que los principales ácidos grasos polinosaturados de mitocondrias hepáticas y renales son sensibles al daño oxidativo. La peroxidación lipídica fue más efectiva en mitocondrias de hígado de rata que en bovino.

531. (7542) MECANISMOS MOLECULARES DE INHIBICION DE RECEPTORES «CYS-LOOP» POR ANTIDEPRESIVOS TRICICLICOS. GUMILAR, FERNANDA ANDREA; BOUZAT, CECILIA

Instituto de Investigaciones Bioquímica de Bahía Blanca

Además de su clásica acción de inhibición de recaptación de aminas biogénicas, los antidepresivos tricíclicos (ADT) inhiben distintos LGICs. Sin embargo, los mecanismos moleculares de inhibición y su relación con los efectos terapéuticos y adversos no han sido hasta ahora dilucidados. Dentro de posibles blancos de estos fármacos se encuentran los receptores de cys-loop, tales como receptores nicotínicos (AChRs) homo y heteropentaméricos y receptor de serotonina 5HT₃. Hemos determinado que los ADT actúan aumentando la desensibilización rápida del AChR muscular heteropentamérico. Como parte de este proyecto estudiamos ahora la acción de ADT (doxepina, imipramina y amitriptilina) sobre receptores nicotínicos homopentaméricos, utilizando como modelo la quimera alfa7-5HT₃ que expresa en células de mamífero. Los registros de patch-clamp en la configuración «cell-attached», muestran que los ADT producen una drástica reducción, dependiente de la concentración, de la frecuencia de apertura (aproximadamente 50 ± 12% a 10 μM) y del tiempo de estado abierto del canal (12 veces a 50 μM). Además, los ADT

producen una reducción significativa, dependiente de la concentración, del pico de las corrientes activadas por perfusión rápida de acetilcolina a células que expresan α 7-5HT[3]. En conclusión, los resultados obtenidos a partir de registros de canal único y de corrientes macroscópicas sugieren que los ADT actúan sobre el receptor α 7-5HT[3] como bloqueadores lentos de canal abierto, pudiendo el receptor pasar de un estado bloqueado a uno cerrado. Al mismo tiempo los ADT podrían estar actuando sobre el dominio extracelular provocando un aumento en la desensibilización. La comparación de estos efectos con los observados sobre receptores 5HT[3] permitirá discriminar las acciones de ADT sobre cada dominio. Subs por ANPCyT, UNS y CONICET.

532. (7740) ENVEJECIMIENTO NATURAL DE LIPOSOMAS: PROTECCIÓN POR EFECTO DE RADICALES NITRÓXIDO. CIMATO, ALEJANDRA NOEMI; FACORRO, GRACIELA B.; PIEHL, LIDIA L.; TORTI, HORACIO E.; HAGER, ALFREDO A.

Cátedra de Física. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

La pérdida de estabilidad debida a lipoperoxidación es el principal problema en el uso extensivo de liposomas en formulaciones farmacéuticas. En el presente trabajo se estudió el envejecimiento natural de liposomas de lecitina de soja y la protección por efecto de los radicales nitróxido hidrosolubles: 2,2,6,6-tetrametilpiperdín-N-óxido (TEMPO) y liposolubles: ácido 5-doxil-esteárico, 12-doxil-esteárico y 16-doxil-esteárico. Se incubaron liposomas unilamelares bajo atmósfera de aire a 37°C en ausencia y presencia de dichos radicales. Se midió en función del tiempo: dienos conjugados, lipohidroperóxidos, TBARS, fluidez de membrana y caída de la señal ESR del radical. Los porcentajes de inhibición de la producción de dienos conjugados e hidroperóxidos fueron (62.0 ± 0.6) % y (64 ± 3) % para el TEMPO y (88 ± 2) % y (93 ± 2) % para los ácidos doxilesteáricos (DSA), respectivamente. La producción de TBARS presentó una fase de latencia de 30 horas para los liposomas controles, y luego un incremento alcanzando un máximo a las 65 horas de incubación. En presencia de los radicales nitróxido, las fases de latencia se prolongaron a 50 horas para el TEMPO y 70 horas para los DSA, alcanzando luego valores similares a los controles. Los porcentajes de inhibición de la producción de hidroperóxidos dependieron de la concentración total de nitróxido, y no fueron proporcionales a sus coeficientes de partición n-octanol/agua. Los cambios en la fluidez de la membrana fueron igualmente prevenidos por ambos tipos de nitróxidos. La caída de la señal ESR fue menor para los DSA que para el TEMPO. Concluimos que ambos tipos de nitróxidos retardaron la lipoperoxidación. Los DSA estudiados presentaron un comportamiento similar entre sí, siendo más eficientes que el TEMPO como antioxidantes. La eficiencia de los radicales nitróxido como antioxidantes dependió directamente de su concentración y lipofiliidad.

533. (7814) FERRITINA: MODIFICACIONES EN ESTRUCTURA Y FUNCIÓN POR TRATAMIENTO CON PEROXINITRITO. ALCALDE, MYRIAM; PUNTARULO, SUSANA; GALLEANO, MONICA

Fisicoquímica- PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento in vitro con peroxinitrito sobre la ferritina y las posibles alteraciones funcionales consecuentes. Apoferritina purificada de bazo de caballo fue expuesta a linsidomina (SIN-1; 0-500 μ M) por incubación en buffer fosfato 100 mM, pH 7,4, bicarbonato 25 mM a 37°C por períodos de hasta 60 min. La fluorescencia asociada a triptofano (long[exc]=285 nm; long[em]=345 nm) decreció significativamente por efecto de la incubación en forma dosis dependiente (-22 \pm 4 y -35 \pm 2% a los 15 min de exposición a 30 y 100 μ M SIN-1, respectivamente). La fluorescencia adscripita a la formación de bitirosina (long[exc]=325 nm; long[em]=405 nm)

no fue afectada significativamente por los tratamientos. El contenido de cisteína (estudiado por resonancia paramagnética electrónica -EPR-) disminuyó significativamente (45 \pm 5%) al cabo de 15 min de incubación con 100 μ M SIN-1. La actividad de ferroxidasa de la apoferritina, estudiada espectrofotométricamente, resultó de 18 \pm 2 μ M Fe(II)/min. μ M ferritina y 9,2 \pm 0,9 μ M Fe(II)/min. μ M ferritina para la proteína control y expuesta a SIN-1 100 μ M durante 30 min, respectivamente. La producción de radicales proteicos derivados de la ferritina fue monitoreada por EPR a 77 K analizando la cinética de formación entre 0 y 30 min de exposición a 100 μ M de SIN-1. Se detectó la presencia de al menos una especie radical, cuya concentración se incrementó en función del tiempo de incubación y con características compatibles con un radical centrado en triptofano. Los resultados sugieren que una elevada concentración en estado estacionario de peroxinitrito conduce a daño en la estructura proteica de la ferritina con posibles alteraciones en la funcionalidad. Estudios posteriores serán necesarios para evaluar la relevancia patofisiológica del fenómeno observado. Este trabajo fue financiado por la ANPCyT, la Universidad de Buenos Aires y el CONICET.

534. (7872) EFECTO DEL OXIDO NITRICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE CHLORELLA SP ANTARTICA. ESTEVEZ, MARÍA SUSANA; PUNTARULO, SUSANA

Fisicoquímica-Pralib, Facultad De Farmacia Y Bioquímica, Universidad De Buenos Aires

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación del óxido nítrico (NO) durante el crecimiento de cultivos de algas antárticas del género *Chlorella* (familia Chlorellaceae). Las células crecieron en medio Bold basal a temperatura de 4°C durante 25 días bajo un fotoperíodo de 12:12 luz:oscuridad. Durante el crecimiento se evidenciaron tres fases de desarrollo característico, fase de latencia (día 1 - 6), fase exponencial, (día 7 - 20) y fase estacionaria, (día 21 - 25). El contenido de NO determinado, por espectroscopía de resonancia paramagnética (EPR), fue detectable en los días 5 (1,3 \pm 0,6 nmol/mg clorofila), 6 (15 \pm 3 nmol/mg clorofila) y 7 (5 \pm 2 nmol/mg clorofila). Las actividades de las enzimas generadoras de NO, nitrato reductasa (NR) y óxido nítrico sintasa-like (NOS-like), mostraron un aumento coincidente con el máximo de NO. La actividad NOS-like disminuyó rápidamente hasta valores no detectables en el día 10 de crecimiento y la actividad NR mantuvo su actividad hasta finalizar la fase exponencial. En presencia de L-NAME 2 mM, inhibidor de la enzima NOS-like, adicionado al comienzo del crecimiento los cultivos no presentaron desarrollo alrededor del día 10. Sin embargo, cuando el inhibidor fue agregado el día 5, la velocidad de crecimiento de los cultivos resultó significativamente afectada (0,18 \pm 0,01 y 0,11 \pm 0,01 día⁻¹), cultivos control y tratados con L-Name, respectivamente) restableciéndose al valor control cuando el inhibidor fue eliminado del medio (0,15 \pm 0,02 día⁻¹). Los resultados presentados sugieren que el NO (o algún metabolito relacionado) podría estar involucrado en las complejas vías de transducción de señales que inician el proceso de activa división celular durante el crecimiento exponencial de cultivos de *Chlorella* sp antártica.

BIOLOGÍA CELULAR 4

535. (6925) PAPEL DE LA TROMBOPOYETINA Y LA PROSTACICLINA EN LA APOPTOSIS DE CÉLULAS MADRES PLURIPOTENTES (CD34+). NEGROTTO, SOLEDAD; POZNER, ROBERTO GABRIEL; D'ATRI, LINA PAOLA; GOMEZ, RICARDO MARTIN (1); LAZZARI, MARIA ANGELA; SCHATTLNER, MIRTA

Academia Nacional de Medicina. (1) Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata

Previamente demostramos que la prostaciclina (PGI₂) y la trombopoyetina (TPO) protegen a los megacariocitos de la

apoptosis inducida por óxido nítrico (ON). En este trabajo estudiamos el papel de estas moléculas en la regulación de la muerte celular programada inducida por privación de suero (SS) y ON en células madres pluripotentes (CD34+). Las células fueron purificadas a partir de sangre de cordón umbilical humano por inmunoselección magnética positiva. La apoptosis se evaluó luego de 24 horas por microscopía de fluorescencia utilizando una mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio y por citometría de flujo evaluando el contenido de ADN por incorporación de yoduro de propidio. La TPO (100 ng/ml) inhibió significativamente la apoptosis inducida por privación de suero (C: 3 ± 1 , SS: $26\pm 3^*$, TPO+SS: $12\pm 2(\#)$ %, n=4) y por el dador de ON, PAPA/ON (100 μ M) (C: 4 ± 1 , ON: $17\pm 2^*$, TPO+ON: $10\pm 1(\&)$ %, n=3). Sin embargo, la PGI[2] (100 ng/ml) no fue capaz de modular la muerte celular inducida por ambos estímulos (C: 4 ± 1 , SS: 26 ± 3 , PGI[2]+SS: 27 ± 2 , ON: 17 ± 2 , PGI[2]+ON: 18 ± 2 %, n=5). La falta de efecto por PGI[2] podría deberse a la ausencia de su receptor de superficie en células indiferenciadas ya que el análogo permeable de AMPc, Dibutiril-cAMP (100 μ M) revirtió significativamente tanto la apoptosis inducida por privación de suero ($12\pm 3(\#)$ %, n=4) como por ON ($10\pm 2(\&)$ %, n=4). * $p < 0.05$ vs control, (#) $p < 0.05$ vs SS, (&) $p < 0.05$ vs ON. Estos resultados demuestran que tanto la TPO como el AMPc protegen la apoptosis de células madres pluripotentes inducida por estímulos diferentes.

536. (6951) CITOGÉNICA DE UNA LÍNEA CELULAR DENDRÍTICA PLASMOCITOIDE INDUCIDA POR ACIDOSIS EXTRACELULAR. SCIURANO, ROBERTA BEATRIZ (1); FABRIS, VICTORIA (1); GONZÁLEZ, PAULA MARIELA (1); VERMEULEN, MÓNICA (2); GEFFNER, JORGE (2); MERANI, MARÍA SUSAN (A (1)

1) Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA (2) IIHema, Academia Nacional de Medicina, Dpto. de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA

Se realizó el análisis citogenético de una línea de células dendríticas plasmocitoides derivadas a partir de precursores de médula ósea de ratones de la cepa C57/B16, cultivados en medio ácido (pH 6.5-6.7) en el IIHema de la Academia Nacional de Medicina. El cariotipo y el número modal de la línea celular en cuatro pasajes diferentes: 3, 5, 8 y 10 fue estudiado con técnicas de bandedo G, C, y DAPI/cromomicina A3. El número modal mostró una marcada poliploidía desde pasajes tempranos, estableciéndose en $2n = 93, 92, 96$ y 83 que corresponden a los pasajes 3, 5, 8 y 10; respectivamente. Las bandas G permitieron la caracterización e identificación de diferentes cromosomas marcadores: dos isocromosomas derivados de los cromosomas 7 y 9; tres cromosomas producto del cromosoma 3, con la adición de una banda en la región próxima al centrómero; fusiones céntricas entre los cromosomas 2/5, 2/4, y 10/5; además, de la presencia constante de tres cromosomas aún más pequeños que el par más pequeño del complemento normal. El análisis del bandedo C no evidenció alteraciones en el patrón de heterocromatina centromérica normal para ratón. El presente estudio, además de identificar los cromosomas marcadores en cada uno de los cuatro pasajes estudiados, puso en evidencia una poliploidía existente desde los primeros pasajes. Estas alteraciones numéricas y estructurales desde pasajes tempranos posiblemente estén relacionadas con la generación de dicha línea celular por el estrés ácido. El estudio de nuevos pasajes y la aplicación de otras variables técnicas en la fina identificación de los marcadores deberán realizarse para poder caracterizar y dar luz a los mecanismos de instalación de esta interesante línea celular.

537. (7253) EFECTOS DE LOS AGES SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE SUS RECEPTORES EN OSTEOBLASTOS MC3T3E1 EN CULTIVO. MERCER, NATALIA; CORTIZO, ANA M(1); HAFIZ, AHMED(2); WONG, TEN-TSAO(2); ETCHEVERRY, SUSANA B(1); VASTA, GERARDO R(2)

(1) Bioquímica Patológica, Fac.Cs.Exactas, UNLP, Argentina; (2) COMB, University of Maryland, USA

El desarrollo de las complicaciones crónicas en pacientes diabéticos descompensados se debería al proceso de glicación, que conduce a la formación de productos de glicación avanzada (AGEs). Estos AGEs, interaccionan con receptores, afectando el metabolismo y turnover tisular. Nuestro grupo demostró en osteoblastos en cultivo la presencia de dos receptores: RAGE y galectina-3 y que su expresión proteica es regulada positivamente por los AGEs. En el presente trabajo investigamos si la expresión génica de los receptores para AGEs presentes en osteoblastos (RAGE y gal-3) así como de galectina-1 (con fines comparativos) es regulada por los AGEs (AGE-BSA) y un ligando típico de galectinas (lactosil-BSA). Osteoblastos derivados de calvaria de ratón (MC3T3E1) se incubaron con los siguientes ligandos (200 μ g/ml): BSA, AGE-BSA, lactosil-BSA o nada, por diferentes períodos de tiempo. Se extrajo el RNA total, se cuantificó y se obtuvo el cDNA, con el cual se realizaron los experimentos de PCR en tiempo real para detectar los niveles de expresión de los genes de RAGE, gal-1 y 3. AGE-BSA estimuló la expresión de ambos genes: gal-3 (rango: 14-27% BSA-control, $p < 0.01-0.001$, 2-12 h) y RAGE (rango: 44-60%, $p < 0.05-0.01$, 2-24h). La incubación de las células con un ligando bona fide para las gal-1 y 3 (lactosil-BSA) resultó también en un aumento en la expresión génica de ambas galectinas: gal-3 (57% control-BSA o nada, $p > 0.001$, 2h) y gal-1 (20%, $p < 0.05$, 2h). El incremento fue transitorio y no se observó después de 2 horas de incubación. En conclusión, en las células osteoblásticas MC3T3E1, la expresión génica de los receptores para AGE RAGE y gal-3 es regulada positivamente por los niveles extracelulares de AGEs en función del tiempo. La neoglicoproteína lactosil-BSA induce la expresión temprana y transitoria de gal-1 y 3.

538. (7259) LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE P8, UNA PROTEÍNA RELACIONADA CON EL DESARROLLO DE TUMORES. VALACCO, MP; VARONE, CL; IOVANNA, JL; MORENO, SM

Depto QB-FCEN-UBA; INSERM, U624, Marsella, Francia

p8, una proteína de 8 kDa, fue identificada por su inducción durante la pancreatitis aguda. Su RNAm se expresa en líneas celulares en respuesta a estrés y factores mitogénicos. Resultados preliminares demuestran que p8 estaría implicada en el desarrollo de tumores y sugieren que p8 podría actuar como un factor de crecimiento celular. Se sabe que in vitro puede ser fosforilada por la PKA y puede ser acetilada por p300. El objetivo del trabajo es estudiar la localización subcelular de p8 y los factores que la afectan. Un análisis exhaustivo de su secuencia, indicaría que p8 tiene una señal de localización nuclear bipartita, y una señal de exportación rica en lisinas. Se estudio la localización subcelular de p8 utilizando la técnica de inmunocitoquímica, con un anticuerpo anti-p8 y un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína. Se estudio la localización en células HeLa, y en células HeLa transfectadas establemente con p8. Se vio que en cultivos de células subconfluentes, la proteína localiza exclusivamente en el núcleo, pero en cultivos de células superconfluentes, se distribuye en toda la célula. La localización de p8, deja de ser nuclear cuando se arresta el ciclo celular por medio de inhibidores específicos o por privación de suero. Se vio que la importación de p8 al núcleo es un proceso dependiente de energía, ya que disminuye al depletar a las células de ATP. La tricostatina A, un inhibidor de deacetilasas de histonas, es capaz de afectar la localización de p8, ya que en cultivos subconfluentes, provoca una deslocalización de la proteína, haciendo que esta se distribuya en toda la célula. En base a estos resultados, podríamos proponer que p8 es una proteína que realiza un movimiento de ida y vuelta constante entre núcleo y citoplasma. A baja densidad el equilibrio estaría desplazado hacia el núcleo debido a la activa importación de p8. En condiciones de arresto celular o de alta densidad celular, se dispararía alguna señal que inhibiría su entrada al núcleo, provocando una distribución uniforme de p8 en la célula.

539. (7400) EFECTOS DEL COMPLEJO VANADIO(IV) – TREHALOSA SOBRE OSTEOBLASTOS EN CULTIVO. MOLINUEVO, MS; CATTÁNEO, E; BRUZZONE, L; ETCHEVERRY, SB; CORTIZO, AM

Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata; División Química Analítica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata

El vanadio es un elemento de transición que, en cantidades traza, ha demostrado ser esencial para el normal desarrollo de los tejidos de mamíferos; en especial para el tejido óseo. Previamente sintetizamos un derivado de vanadio(IV) con el disacárido trehalosa (TreVO) y estudiamos sus efectos biológicos sobre osteoblastos en cultivo. Este complejo posee propiedades insulino-miméticas: entre 5-75 mM estimula el consumo de glucosa y promueve la proliferación celular en una línea de osteoblastos normales MC3T3E1. Estos efectos parecerían estar mediados por la activación de la vía de señalización de la PI3K – Erk. Por otro lado, TreVO inhibe la proliferación de las células UMR106, derivadas de un osteosarcoma de rata, en todo el rango de concentraciones testeadas (10 – 100 mM). En el presente trabajo estudiamos los efectos del estrés oxidativo inducido por TreVO, con el fin de explicar las diferencias anteriormente reportadas sobre la proliferación de ambas líneas celulares. Para ello medimos la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por el método de la dihidrorrodamina y la funcionalidad de la mitocondria por el método del nitro-blue-tetrazolium (NBT). TreVO (250-500 mM) induce un incremento en la producción de ROS en las células MC3T3E1 (150% basal, $p < 0.02$). En las células del osteosarcoma, el incremento de los ROS es más potente (126-200% basal, $p < 0.01$, TreVO 100-500 mM). Además, este complejo causa tanto una mayor disminución en la funcionalidad mitocondrial (24-34% basal, $p < 0.02$, 10-500 mM) como un incremento en la apoptosis (25-45% basal, $p < 0.02$, 100-500 mM) de las células UMR106. En conclusión, los efectos tóxicos de este compuesto podrían ser atribuidos a un incremento en la producción de ROS que causan una disminución en la viabilidad celular del osteosarcoma, sugiriendo una potencial aplicación terapéutica del TreVO en este tipo de tumores.

540. (7447) CARCINOMA DE COLON HUMANO. ROL DE LOS MASTOCITOS. BELLIDO, MARIANA (1); MAURO, LAURA (2); PURICELLI, LYDIA (2); LASTIRI, JOSÉ (3); PALLOTA, GUADALUPE (3); BONADEO, FERNANDO (3); LAURIA, LILIA (1)

1: Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEyN, UBA.; 2: Area de Investigacion, Instituto de Oncología AH Roffo 3: Hospital Italiano de Bs.As.

Los mastocitos (MC) humanos se clasifican en dos fenotipos según el tipo de proteasas que expresan: MCt positivos solo para triptasa y MCtq positivos para triptasa y quimasa. Ambas enzimas pueden modular distintas fases del desarrollo tumoral como la invasión y angiogénesis. El objetivo fue investigar la expresión de MCt y MCtq en relación con la densidad de microvasos CD34+ (DMV) y otros parámetros clinicopatológicos en 58 pacientes con cáncer de colon libres de tratamientos previos (18 Duke A, 18 Duke B, 22 Duke C1). La cuantificación de MCt, MCtq y DMV se hizo por inmunohistoquímica bajo microscopio a 100x refiriéndolos a 1.2 mm² en zonas normales (N), intratumorales (IT) y frentes de invasión (FI). Evaluación: X2, Correl. Pearson. Cálculo sobrevida 5 años: Log Rank Test. En todos los Duke (D) analizados, se encontró menor número de MCt y MCtq en IT que en FI ($p < 0.001$), siendo MCt el fenotipo dominante en todas las zonas ($p < 0.05$). En FI el número de MCt y MCtq correlacionó con DMV ($p < 0.01$). En IT hubo disminución de MCt y MCtq en correspondencia con el grado de D ($p < 0.05$) atribuible a la reducción de tamaño de los MC por la desgranulación, que impide observarlos a 100x. Se observó positividad para triptasa en el estroma. El análisis univariado no mostró asociación significativa entre pacientes con alta o baja expresión de MCt, MCtq o DMV y sobrevida a cinco

años. Los resultados muestran que los MCt son el fenotipo dominante y serían los más involucrados en la progresión tumoral. La correlación entre MC y DMV coincide con la acción proangiogénica de la triptasa. El alto número de MCtq en FI, permite inferir su rol en la potenciación de este proceso. La correlación entre la disminución de MC y D sugiere un mayor estímulo para la desgranulación por parte de tumores más agresivos.

541. (7513) MARCADORES DE ESTRÉS OBSERVADOS EN CÉLULAS CHO EXPUESTAS A ARSÉNICO. SORIA, ELIO ANDRES; EYNARD, ALDO R.; BONGIOVANNI, GUILLERMINA

Inst. Biología Celular, Fac. Ciencias Médicas, Univ. Nac. Córdoba-Argentina

Introducción: El arsénico es un agente cancerígeno altamente concentrado en las capas freáticas del sudeste de la Provincia de Córdoba (hasta 8 μM). El consumo de este agua produce HACRE (hidroarsenicismo crónico regional endémico) y generalmente deriva en cáncer de piel, vejiga o pulmón. Se ha descrito que el arsénico actúa como un estresor pro-oxidante que induce la expresión de Hsp (heat shock proteins) y activa moléculas transductoras de señales como SAPK2, p38 (stress-activated protein kinases) y MAPK (mitogen-activated protein kinases) las cuales afectan el crecimiento y la diferenciación celular. Objetivo: Encontrar marcadores de la respuesta a estrés y de la citotoxicidad inducidos por arsénico en cultivos celulares (no tumorales) para posteriormente estudiar moduladores de esas respuestas. Metodología: Cultivo celular: línea celular CHO K1 en medio DMEM con 10% SFB. Se determinará expresión de Hsp70 por Western blot, efectos sobre microfilamentos de actina por inmunocitoquímica y peroxidación lipídica por medición de dienos conjugados en lípidos de membranas. Resultados: Se observó un máximo de expresión de Hsp70 luego de 1 ½ hs de incubación con 200 μM arsenito de sodio, seguido de 3 hs de recuperación sin arsenito. Luego de 2 ½ hs de incubación con 200 μM arsenito de sodio se observó reordenamiento de los filamentos de actina con alteraciones de la forma celular y elevación de la concentración de dienos conjugados (Abs 334 nm/ mg proteína: 173 ± 42 respecto 100% del control). Además el aumento de dienos conjugados pudo ser prevenido por el agregado de un antioxidante al medio de cultivo. Conclusión: El arsenito de sodio produce estrés en células CHO y esta respuesta puede ser evidenciada por la expresión de Hsp70, cambios morfológicos, alteraciones del citoesqueleto y aumento de la peroxidación lipídica.

542. (7854) CITOTOXICITY OF BOTHROPS ALTERNATUS VENOM MEASURED BY AN IN VITRO LEUKOCYTES CULTURE ASSAY. BUSTILLO, SOLEDAD (1,2); LUCERO, HORACIO (1); LEIVA, LAURA (2); ACOSTA, OFELIA (3); GORODNER, JORGE (1)

Instituto de Medicina Regional, UNNE, Av. Las Heras 727, (3500) Resistencia; (1)Inst. de Medicina Regional, UNNE. (2)FaCENA, UNNE. (3)Fac. de Cs.Veterinarias, UNNE, Corrientes.

The aim of this work was to evaluate whether a simple in vitro assay could reflect the toxicity of snake venoms. The cytotoxic effect of Bothrops alternatus venom was determined by the survival of viable cells in culture upon exposure to the toxic agent. Cell cultures were prepared in screw-cap plastic flasks containing RPMI-1640 medium, Calf serum, phytohemagglutinin, Gentamycin and human leukocyte-rich plasma. These flasks were incubated at 37°C in 5%CO₂ for 48 hours. Aliquots of B. alternatus venom were added to the cultures. Phosphate buffer, instead of venom, was used as control. Flasks were incubated at 37°C in 5%CO₂ for different times, after that, aliquots of cell suspension were diluted with Tripan Blue. Viable and non-viable cells could be distinguished with the use of a hemacytometer. Cytotoxicity was estimated as percentage of surviving cells. Venom caused an increase of cellular death. Values obtained were significantly different from control cells ($p < 0.001$). The major effect was

observed 90 minutes after venom addition at the major concentration (0,10 mg/ml) venom solution.

time min	control (% surviving cells)	venom (0,01 mg/ml) (% surviving cells)	venom (0,10 mg/ml) (% surviving cells)
0	74,9±0,8	74,0±1,8	75,0±1,3
30	61,5±0,9	56,0±1,2	48,5±0,5
90	56,5±2,4	49,5±0,8	35,2±0,4
180	40,8±1,3	35,0±1,5	28,8±0,2

The cytotoxicity of snake venoms can be determined by a simple assay with leukocytes from fresh blood instead of cell lines. This assay provide, as advantage over traditional in vivo toxicity assay in animals, the possibility of evaluate, or even compare, the toxicity of snake venoms.

543. (7898) INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE FOSFATASA ALCALINA CON DEXAMETASONA EN CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA. PASCUAL GARRIDO, CECILIA (1,2); SANTINI ARAUJO, MARIA GALA (1,2); MAKINO, ARTURO (1,2); IELPI, MARCELO (2); HIDALGO, ALEJANDRA (2); MUSCOLO, LUIS (1)

1: Servicio de Ortopedia y Traumatología. Hospital Italiano de Buenos Aires 2: ICBME

Introducción: Las células stem mesenquimales humanas (CMH) han sido usadas como fuente principal para facilitar la regeneración del tejido óseo in vivo. Recientemente fue demostrado en un modelo animal que las CMH tratadas con dexametasona previamente a la implantación, generaron mayor cantidad de tejido óseo en menor tiempo. Este estudio investiga si las células de la médula ósea cultivadas en medios osteogénicos con una mayor concentración de dexametasona, muestran un aumento de la diferenciación osteoblástica y actividad celular. **Métodos:** Se aspiraron muestras de 3ml de medula ósea humana de cresta ilíaca, con una jeringa de 10ml con 1ml de solución salina conteniendo 100 unidades de heparina. Las células nucleadas fueron obtenidas mediante gradiente de densidad y expandidas ex vivo en Alpha-MEM, 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), y ATB a una concentración de 1×10^6 células. Una vez lograda la confluencia celular se realizó repique y se procedió a dividir randomizadamente los cultivos en tres grupos: Grupo control: Medio no diferenciador. Grupo osteogénico: 1×10^8 dexametasona. Grupo dexametasona: 5×10^8 dexametasona. Se realizó la medición de fosfatasa alcalina en días 4, 12 y 21. La morfología celular fue evaluada mediante la tinción con hematoxilina y eosina. **Resultados:** Las células expuestas a ambas concentraciones de dexametasona demostraron un significativo aumento en la fosfatasa alcalina ($p < 0,001$) con respecto al control. Se pudo observar un cambio morfológico de las células tratadas con dexametasona con respecto al control cambiando estas de una morfología fibroblástica (como la del grupo control) a un fenotipo epiteloide. De acuerdo a estos resultados el tratamiento de las CMH con altas concentraciones de dexametasona podría inducir una mayor actividad celular que podría aumentar la formación de hueso al ser implantadas in-vivo.

544. (8093) DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITE EN CÁNCER COLORRECTAL. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR. CABRERA, GABRIEL; CHIALINA, SERGIO; FORNES, CLAUDIA; DE LA VEGA ELENA, DANIEL; LANDI, CAROLINA; SOLIS, EDITA

Servicio de Medicina Transfusional. Hospital Italiano Garibaldi. Rosario.

La inestabilidad de ADN Microsatélite (MSI) caracteriza un mecanismo particular de carcinogénesis colorrectal. Se presenta en más del 90% de las personas con Cáncer de Colon No Polipoide Hereditario (HNPCC) debido a la herencia de mutaciones en alguno de los genes del sistema de reparación mismatch del ADN. Si bien el diagnóstico definitivo se realiza mediante

secuenciación, se recomienda llevar a cabo previamente un screening de MSI utilizando un panel de referencia de cinco microsatélites establecidos en un workshop internacional. El objetivo de este trabajo fue optimizar los protocolos de amplificación de los microsatélites del panel de referencia para realizar screening de MSI. Se realizaron extracciones de ADN de sangre periférica y de tejido tumoral incluido en parafina, ampliificaciones en distintas condiciones de los microsatélites y electroforesis de los productos ampliificados en geles de agarosa y poliacrilamida. (El revelado se realizó con bromuro de etidio y sales de plata respectivamente). Para las ampliificaciones se tomó como referencia el protocolo descrito en Schlegel, J., et al., 1995 y se estudió el efecto ejercido sobre la amplificación de la concentración de primers, $MgCl_2$ y ADN, temperaturas de annealing de los cebadores, número de ciclos de amplificación y pureza del ADN extraído. A partir de los estudios realizados se consiguió unificar las condiciones de amplificación para los 5 microsatélites de acuerdo al tejido del cual se extraía el ADN y se logró amplificar, en un estudio final, el 100% de las muestras analizadas sobre un total de 60 ensayos, 30/30 en el caso de las ampliificaciones realizadas a partir de ADN extraído de sangre periférica y 30/30 en el caso de ADN extraído de tejido tumoral.

BIOLOGÍA MOLECULAR 2: BIOLOGÍA ESTRUCTURAL

545. (6910) ESTUDIO DEL PLEGAMIENTO DE LB-FABP EN SOLUCIÓN Y EN INTERFASES LIPÍDICAS NOLAN, VERONICA; PERDUCCA, MASSIMILIANO; MONACO, HUGO; MONTICH, GUILLERMO

CIQUIBIC-Dpto Qca Biol Fac Cs Qcas UNC; Facoltà di Scienze, Università di Verona, Italia

Nuestros estudios anteriores demostraron que Lb-FABP unida a membranas lipídicas tiene las características de un glóbulo fundido. Hemos iniciado estudios de la proteína en solución utilizando espectroscopia de absorción en el infrarrojo, fluorescencia, difracción circular y cromatografía de exclusión molecular para conocer si ésta se une en forma nativa y es el ambiente de la membrana que induce el cambio conformacional o si es un intermediario de plegamiento presente en solución el que se une a la interfase. Por estudios de mezclado rápido de fluorescencia y difracción circular se comenzaron estudios cinéticos de la unión de la proteína a la membrana lipídica y del plegamiento de la proteína en solución. Se encontró un estado de Lb-FABP en condiciones de equilibrio en medio ácido que posee características de glóbulo fundido: pérdida de estructura terciaria, expansión del volumen, residuo triptofano protegido del contacto con el solvente y alto contenido de estructura secundaria. Los estudios cinéticos preliminares indicarían que el desplegamiento parcial ocurriría en inmediaciones de la membrana y ocurre con mayor rapidez que la unión efectiva a la membrana.

546. (6997) CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE SISTEMAS LÍPIDO-DNA CHIARAMONI, NADIA; TAIRA, MARÍA CRISTINA; SCHREIER, SHIRLEY; ALONSO-ROMANOWSKI, SILVIA

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes; Laboratorio de Biología Estructural, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, Brasil.

Estudios recientes han demostrado que los liposomas no cargados pueden, al igual que los liposomas catiónicos, transfectar DNA a líneas celulares. De allí nuestro interés en saber que conformación adopta el DNA cuando esta en contacto con liposomas. Existen varias conformaciones que pueden adoptar los ácidos nucleicos. Las más comunes son la A (adoptada mayormente por el RNA) y la B (adoptada mayormente por el DNA). El objetivo de este trabajo es analizar las conformaciones que adopta el DNA plasmídico cuando está en contacto con lípidos de diferentes cargas (lípidos catiónicos y lípidos no-cargados). Para el análisis

conformacional se utilizó difracción circular. Para analizar el nivel de empaquetamiento de las bicapas se utilizó la sonda Merocianina 540. Esta sonda posee un espectro característico cuando esta en ambiente hidrofílico u hidrofóbico. El nivel de empaquetamiento de los diferentes liposomas fue seguido por el índice de hidrofobicidad (relación de absorbancias a 570 y 500 nm). Con los parámetros obtenidos es posible inferir una relación entre el empaquetamiento de la bicapa lipídica y la conformación adoptada por el DNA para cada sistema en particular. Encontramos que cuando el DNA es liofilizado en presencia de liposomas no-cargados la conformación no cambia significativamente y mantiene la conformación inicial, tipo B. En cambio cuando el DNA se liofiliza en presencia de liposomas catiónicos se produce un cambio conformacional grande. La conformación resultante es similar a la conformación A, adoptada por el RNA. Este cambio en la conformación de B a A implica una deshidratación del 20% de la cadena de DNA. Además, cuando se analizaron los índices de hidrofobicidad de las bicapas se encontró que los liposomas catiónicos poseían más defectos hidrofóbicos que los liposomas no cargados. Esto puede ser debido a que al haber una interacción de cargas entre el DNA y los liposomas catiónicos aumenta el radio de la monocapa externa. Se propone un modelo que es representativo de los datos obtenidos.

547. (7241) PURIFICACIÓN DE GFP POR EXTRACCIÓN ORGÁNICA. MARIANA, ARIS; M. CRISTINA, TAIRA; SILVIA, ALONSO-ROMANOWSKI

Laboratorio de Biomembranas - Departamento de CyT - Universidad Nacional de Quilmes -

Antecedentes: EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) es una mutante de GFPwt (P64L y S65T), compuesta por 238 residuos, con un PM de 27 KDa. La mutación P64L, la sustitución de un aminoácido voluminoso por un residuo alifático más pequeño incrementa la eficiencia de plegamiento y la mutación S65T estabiliza la forma aniónica del fluoróforo, obteniendo un solo pico máximo de excitación. EGFP fluoresce con mayor intensidad que GFPwt y el plegamiento y formación del fluoróforo de la proteína es óptimo a 37°C. Los métodos de purificación de la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) emplean en general cromatografía de afinidad, aprovechando la adición en su estructura de una terminal de Histidina (His-tag) en el extremo N ó C de la proteína. En este trabajo se utiliza un método alternativo de purificación de GFP, que incluye extracciones con diferentes solventes orgánicos. Objetivo: purificación de la proteína EGFP por extracción orgánica. Material y método: se purifica EGFP por extracción orgánica utilizando diferentes solventes orgánico completando el proceso mediante cromatografía de interacción hidrofóbica. Se analizó la pureza de las fracciones por SDS-PAGE y espectrofotometría UV-visible y fluorescencia. De la purificación de EGFP por este método se obtiene una proteína altamente homogénea con propiedades espectroscópicas indistinguibles de la misma proteína purificada por otros métodos. Se analizaron fracciones de la purificación por SDS-PAGE, obteniendo una proteína de 27 KDa con alto grado de pureza, sin observarse la presencia de otras proteínas contaminantes. El análisis del pool de las fracciones puras presentan un espectro UV-visible típico de proteínas. Los espectros de emisión y excitación de las fracciones revelan, además de su propiedad fluorescente, su alta sensibilidad, pudiendo detectarse concentraciones de proteína del orden de 10(-7)M.

548. (7569) ESTRUCTURA RESIDUAL EN FRAGMENTOS DE LA β -LACTAMASA RISSO, VALERIA A.; SANTOS, JAVIER; SICA, MAURICIO P.; FERREYRA, RAUL G.; GEBHARD, LEOPOLDO G.; ERMACORA, MARIO R.

Universidad Nacional de Quilmes

Se evaluó el contenido informacional a lo largo de la cadena polipeptídica para generar estructura secundaria y terciaria estable. Se prepararon por ingeniería genética fragmentos de la β -lactamasa de *Bacillus licheniformis*. Los fragmentos producidos

en *E. coli* se purificaron y el contenido de estructura fue analizado por difracción circular (CD). Las propiedades hidrodinámicas y el estado de agregación de los fragmentos replegados fueron estudiadas por cromatografía de exclusión molecular (SEC-FPLC) y entrecruzamiento con glutaraldehído. Se observó en solución con alta frecuencia la presencia mayoritaria de agregados diméricos, sugiriendo un posible mecanismo general de estabilización inespecífica de fragmentos proteicos. La cooperatividad de la estructura existente fue estudiada por desnaturalización térmica seguida por CD a 220 nm. La extrema sensibilidad a la proteólisis observada en los fragmentos indicó ausencia de estructura rígida. El carácter no cooperativo de la estructura residual existente en los estados parcialmente plegados de estos fragmentos podría ser explicado en términos de una desestabilización entálpica y una compensación entrópica. La presencia de actividad enzimática en los fragmentos ES- β L tr41/295, ES- β L tr27/286 y ES- β L tr27/281 podría indicar que la información para adquirir estructura terciaria rígida no está distribuida homogéneamente en la secuencia. Los datos presentados no permiten establecer si en el resto de los fragmentos preparados (ES- β L tr27/276, ES- β L tr64/216, ES- β L CP217/63) se ha eliminado un elemento informacional clave o se ha desestabilizado de manera global la estructura 3D de los mismos.

549. (7670) ESTRUCTURACION DE LA TOPOGRAFÍA LATERAL DE MONOCAPAS POR PLP Y MEZCLAS LIPIDICAS. ROSETTI, CARLA MARIANA; MIZUTAMARI, KIYOMI; RODRIGUEZ, PABLO; MAGGIO, BRUNO

CIQUIBIC-Depto. de Química Biológica-Fac de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Córdoba; CEPROCOR, Córdoba.

Las membranas de mielina disueltas en solvente pueden formar monocapas en la interfase agua-aire que muestran una topografía heterogénea a altas y bajas presiones laterales. El objetivo del presente trabajo fue determinar el rol de las proteínas de mielina y de los componentes lipídicos en la organización topográfica de la superficie. Para ello se comparó la topografía, observada por microscopía de Angulo de Brewster y Epifluorescencia, de monocapas preparadas a partir de la mezcla compleja de lípidos de mielina o de mezclas de lípidos definidos y proporciones variables de PLP (una de las proteínas mayoritarias de mielina). Se determinó que el PLP en ausencia del resto de los componentes proteicos y junto con los lípidos de la mielina es capaz de reproducir el comportamiento topográfico de superficie de la mezcla total cuando la fracción molar de PLP está por encima de un valor umbral. A altas presiones de superficie se forma una fase de naturaleza fractal que parece originarse en un proceso de agregación lateral irreversible, y su extensión depende de la proporción de PLP y del tiempo transcurrido desde la formación del film. El agregado de PLP a una mezcla de POPC y Colesterol que presenta coexistencia de fases líquido ordenada-líquido expandida a presiones inferiores a 5-6mN/m y es homogénea a presiones mayores, induce una topografía con coexistencia de dominios redondeados a presiones de superficie bajas y dominios de aspecto fractal a presiones altas. La mezcla ternaria logra reproducir la topografía de la mezcla compleja de mielina. Además, el agregado de PLP a monocapas de POPC, que son topográficamente homogéneas a todas las presiones de superficie, no induce ninguna inhomogeneidad.

550. (7672) SURFACE BEHAVIOR AND LIPID INTERACTION OF ALZHEIMER β -AMYLOID PEPTIDE 1-42: A MEMBRANE-DISRUPTING PEPTIDE. AMBROGGIO, ERNESTO; KIM, DENNIS H.; SEPAROVIC, FRANCES; BARROW, COLLIN J.; BARNHAM, KEVIN J.; BAGATOLLI, LUIS A.; FIDELIO, GERARDO D.

University of Melbourne, Australia. University of Southern Denmark, Denmark

Amyloid aggregates, found in patients that suffer from Alzheimer's disease, are composed of fibril forming peptides in

a β -sheet conformation. One of the most abundant components in amyloid aggregates is the beta amyloid peptide 1-42 (A β 1-42). Membrane alterations may proceed to cell death by either an oxidative stress mechanism, caused by the peptide and synergized by transition metal ions, or through formation of ion channels by peptide interfacial self-aggregation. Here we demonstrate that Langmuir films of A β 1-42, either in pure form or mixed with lipids, develop stable monomolecular arrays with a high surface stability. By using micropipette aspiration technique and confocal microscopy we show that A β 1-42 induces a strong membrane destabilization in giant unilamellar vesicles (GUVs) composed of palmitoylcholine, sphingomyelin and cholesterol, lowering the critical tension of vesicle rupture. Additionally, A β 1-42 triggers the induction of holes (pores) at the membrane allowing a sequential leakage of low and high molecular weight markers trapped inside the GUVs, but preserving the vesicle shape. We conclude that A β 1-42 sequence confers particular molecular properties to the peptide that in turn influence particular supramolecular properties when is associated to membranes which may result in toxicity: i) an ability of the peptide to strongly associate with the membrane, ii) a reduction of lateral membrane cohesive forces, and iii) a capacity to break the transbilayer gradient and puncture sealed vesicles. The results imply that the neurotoxic action of A β 1-42 may be involved primarily at the membrane level.

551. (7747) C-JUN INTERACCIONA CON FOSFOLÍPIDOS Y C-FOS EN INTERFASES. DEL BOCA, MAXIMILIANO; BORIOLI, GRACIELA; MAGGIO, BRUNO

CIQUIBIC – Dpto. Química Biológica - Facultad de Ciencias Químicas- Universidad Nacional de Córdoba

Los genes de expresión temprana se expresan rápidamente frente a un estímulo en una gran variedad de procesos celulares. c-Fos y c-Jun son los principales miembros de dos familias de genes de expresión temprana que se asocian, a través de un cierre leucina, para formar un complejo conocido como proteína activadora 1 (AP-1) que regula selectivamente la transcripción de genes blanco. La asociación al ADN promotor de estos genes para regular la actividad transcripcional es llevada a cabo por el dímero AP-1. Mientras c-Fos aparentemente sólo forma heterodímeros, c-Jun puede homodimerizar para formar AP-1. La participación de AP-1 y sus componentes en crecimiento y diferenciación ha sido extensamente estudiada, pero permanece incierta la naturaleza de la asociación entre ambas proteínas. c-Fos es capaz de modular la síntesis de fosfolípidos en el retículo endoplásmico, independientemente de su papel como regulador transcripcional. En este sentido, la naturaleza anfitrópica de c-Fos, así como su capacidad para interactuar preferencialmente con fosfolípidos aniónicos, y para modular de manera diferencial la actividad de fosfolipasas, han sido descriptas. En el presente trabajo se utiliza el sistema de monocapas para estudiar el comportamiento en interfase de c-Jun y analizar las interacciones c-Jun/c-Fos. Nuestros resultados muestran que c-Jun es una proteína anfitrópica capaz de formar monocapas estables, y de interactuar no selectivamente con fosfolípidos en una interfase agua aire. Adicionalmente, estudios realizados con mezclas c-Fos/c-Jun demuestran que la formación interfacial del complejo AP-1 es termodinámicamente favorable, siendo este muy estable en una interfase agua-aire. El presente trabajo fue financiado por FONCyT, CONICET, Fundación Antorchas, SeCyT-UNC y Fundación James S. McDonnell.

552. (7881) STABILITY OF ESCHERICHIA COLI BETA-GALACTOSIDASE IN A HETEROGENEOUS MEDIUM. SANCHEZ, JULIETA MARIA; PERILLO, MARIA ANGÉLICA

Depto. Química. F.C.E.F. y N.- U.N.C. Av. Velez Sarsfield 1611, X5016CAG Córdoba, Argentina

In previous works we demonstrated that β -Gal/lipid interaction could modulate the enzyme activity. This modulation could be exerted by a change in the intrinsic reaction mechanism of β -Gal

catalyzed reaction as well as in the protein conformation. We showed that enzyme-lipid interaction protected the enzyme from its irreversible inactivation at high temperatures (above 40°C). In the present work we studied the correlation between the preservation of the enzyme activity and the conformational stability in the presence of phosphatidyl choline multilamellar vesicles (MLVs). Protein conformation studies in the presence or absence of MLVs were performed using intrinsic fluorescence (IF) measurements and differential scanning calorimetry. Emission spectra of the enzyme in the presence of MLVs showed a decrease in the maximal wavelength and an increase in the fluorescence intensity, respect to what was observed with free enzyme. Inner filter effects of these samples were corrected mathematically. From the data of acrylamide-induced quenching of β -Gal IF emission, Stern-Volmer constants values were determined: $K[SV/water]=6.5$ and $K[SV/MLVs]=0.15$ with or without MLVs, respectively. Thermal effects analysis of β -Gal IF showed that the decrease of IF was lower in the presence of MLVs respect to that measured without lipids (34% and 50%, respectively). DSC thermograms showed a non two-state thermal denaturation of the enzyme both free and bound to MLVs. However, the thermal transition seemed to be less cooperative and the aggregating temperature of the unfolded β -Gal increased in the presence of MLVs. These results suggested that, when the protein was bound to MLVs, the tryptophan residues were localized more deeply in the protein core or occluded in the dehydrated lipid-protein interface. This conformational state and/or localization of the enzyme would prevent its thermal inactivation.

553. (7920) PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF A YEAST STEROL CARRIER PROTEIN (SCP-2) WITH FATTY-ACID AND FATTY-ACYL-COA BINDING ACTIVITY. FERREYRA, RAUL G.^{1*}; MILIKOWSKI, DANIEL^{1,2}; MELEN, GUSTAVO³; KORNBLITH, ALBERTO R.^{3*}; DELL' ANGELICA, ESTEBAN C.[±]; SANTOMÉ, JOSÉ A.^{2*}; ERMÁCORA, MARIO R.^{1*}

¹Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes.

²QuiFIB, FFyB, UBA. ³Dpto. Fisiol. Bio. Mol. Cel., FCEN, UBA. [±]CONICET. [±]Dpt. Hum. Gen., UCLA, USA.

We previously reported the cloning, expression and characterization of a new member of the sterol-carrier protein (SCP-2) gene family from the tropical-marine dimorphic-yeast *Yarrowia lipolytica*. In this work we present a physicochemical characterization of the recombinant *Y. lipolytica* SCP-2 protein purified from *E. coli* cells. YLSCP-2 is expressed in particular when *Y. lipolytica* is grown on fatty acids. In agreement, recombinant YLSCP-2 binds fatty acids and palmitoyl-CoA (p-CoA) with nano and micromolar affinity, respectively. Only a few examples of yeast SCP-2 are known: the best characterized, PXP-18, was purified from *Candida tropicalis* and, unlike YLSCP-2, it was reported as devoid of fatty-acid binding activity. Since animal SCP-2 are well-known for their ability to bind fatty acids and fatty acyl CoA, the fact that YLSCP-2 also does so suggests that SCP-2 is a general fatty acid binding protein in all eukaryotic cells.

554. (7982) ESTUDIO POR DINÁMICA MOLECULAR DE LA PRESIÓN COMO VARIABLE PARA LAS TRANSICIONES ESTADO NATIVO-DESNATURALIZADO. MCCARTHY, ANDRÉS NORMAN; GRIGERA, JOSÉ RAÚL

IFLYSIB (CONICET-UNLP-CIC)

El efecto de la presión en las estructuras proteicas posee importancia tanto desde el punto de vista de las aplicaciones (que incluye la esterilización de alimentos por presión) como desde el punto de vista básico. La disminución de la interacción hidrofóbica por efectos de la presión parecería ser el factor predominante en los procesos estructurales. Se ha sugerido que las estructuras que se producen al aumentar la presión pueden ser

identificadas con intermediarios del plegamiento. El objetivo del presente trabajo consiste en la aplicación de la técnica de Simulación por Dinámica Molecular a un sistema de lisozima en agua. La Estructura de partida para dicha enzima se tomó de datos cristalográficos de la literatura. La simulación se realizó con el paquete de software Open Source, GROMACS 3.1, sobre un sistema operativo LINUX. Se trabajó en el rango de presiones de 0,1013 a 303,9 MPa (1 bar a 3 Kbar). Se obtuvieron trayectorias entre 0,1013 y 303,9 MPa a saltos discretos de 10,13 MPa. Las trayectorias de los extremos se prolongan por 16 ns. El estudio de las comparaciones entre las estructuras estabilizadas durante 16 ns a 0,1013 y 303,9 MPa muestra un cambio de movilidad de ciertos residuos que presentan una estructura más compacta a mayores presiones, consistentemente el radio de giro disminuye con la presión. Por otro lado ciertos residuos observan una mayor movilidad lo cual daría cuenta de la liberación de residuos asociados por interacción hidrofóbica. Actualmente se están estudiando las trayectorias de un sistema gemelo de lisozima en solución de agua pesada (D₂O), con el objetivo de recabar alguna información adicional respecto del rol de los puentes de hidrógeno en relación a las mencionadas interacciones hidrofóbicas. Asimismo se estudia la evolución estructural de la proteína con la presión.

- 555. (8100) DELETIONS REVEALS SEQUENCE SEGMENTS NONESSENTIAL FOR PROPER FOLDING OF B. LICHENIFORMIS β -LACTAMASE** FERREYRA, RAUL G.^{1,2}; GEBHARD, LEOPOLDO G.^{1,2}; RISSO, VALERIA A.¹; SANTOS, JAVIER^{1,2}; NOGUERA, MARTIN E¹; ERMÁCORA, MARIO R.^{1,2}

¹Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

A large body of convincing evidence indicates that not all residues in a protein are equally important for the acquisition of the native structure. Whereas some positions within a sequence tolerate multiple changes, others cannot be modified without drastically altering folding or stability. The importance of a sequence segment in determining protein folding can be examined by engineering deletions in a polypeptide chain. Therefore, the content of conformational information can be mapped into the sequence. Several truncated mutants of *Bacillus licheniformis* β -lactamase, a middle-size protein with intermediate topological complexity, were prepared in order to examine the functional and structural role of different parts of the sequence. This approach identified regions of the sequence that are non-essential for proper folding.

- 556. (8106) HIDRATACION DEL EXENDIN-4 Y DEL GLP-1 EN SOLUCION ACUOSA CON Y SIN APANTALLAMIENTO. MODELIZACION MEDIANTE DINAMICA MOLECULAR.** DONNAMARIA, M CRISTINA; MONACHESI, SILVIA N; GRIGERA, J RAUL

IFLYSIB, CIC, CONICET, UNLP, C.C 565, La Plata, Argentina donna@ipsat.com

En el presente trabajo se estudian las propiedades de hidratación del Exendin-4 (Ex4) y del glucagon-like-peptide (GLP-1) en solución acuosa con y sin apantallamiento eléctrico (medio fisiológico). El interés en ambos péptidos (39 y 30 aminoácidos) radica en la importancia de su acción glucoreguladora, siendo potenciales agentes en el control de la diabetes y de la obesidad. El Ex4 (originariamente aislado de la saliva del lagarto de Gila) comparte el 53% de homología con el GLP-1 (segregado en el intestino de mamíferos) con un tiempo medio de vida superior al del GLP-1. Se realiza la modelización con dinámica molecular DM (GROMOS96) a temperatura y presión constantes durante 1,1 ns con 3709 moléculas de agua SPC/E rodeando al Ex4 y 2302 al GLP-1. La flexibilidad de las proteínas es analizada mediante las desviaciones cuadráticas medias de las trayectorias de DM respecto de las originales NMR. Se observa

mayor movilidad en los residuos terminales y en solución fisiológica. Este efecto se acentúa en el GLP-1. La existencia de puentes H internos entre residuos brinda características de hélice (residuos 7-29) al EX-4 y al Glp-1 (corte en GLY16) coincidiendo con datos NMR. El patrón de puentes H en agua (histograma) con preferencia de red dinámica de estructura tetrahédrica, indica el carácter hidrofóbico de los péptidos. Los resultados de DM coinciden con evidencia experimental de conformaciones helicoidales. La estadística de formación de puentes H indica que la presencia peptídica modifica el patrón de ligadura de puentes H del agua SPC/E, así como sus propiedades dinámicas, existiendo además puentes H internos que estabilizan las conformaciones. MCD y JRG son investigadores CIC y CONICET respectivamente, SNM es Doctorando FCE-UNLP.

BIOLOGÍA MOLECULAR 3: ESPECTROSCOPIAS Y RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN 2

- 557. (7179) LA INTERACCIÓN DE MICROCIINA J25 CON INTERFASES FOSFOLIPÍDICAS INDUCE CAMBIOS EN EL ENTORNO DE SUS TIROSINAS.** BELLOMIO, AUGUSTO; CURTO, LUCRECIA; F. DE ARCURI, BEATRIZ; MAGGIO, BRUNO; DELFINO, JOSÉ M.; MORERO, ROBERTO D.

INSIBIO (CONICET-UNT) - IQUIFIB (UBA-CONICET) - CIQUIBIC (UNC-CONICET)

Microcina J25 (MccJ25) es un péptido antimicrobiano de 21 residuos de aminoácidos [G(1)-G-A-G-H(5)-V-P-E-Y-F(10)-V-G-I-G-T(15)-P-I-S-F-Y(20)-G] y con una estructura tridimensional inusual. El extremo N-terminal forma una unión amida con el carboxilo-gamma del Glu8, generándose un anillo de 8 residuos. La cola (Tyr9 a Gly21) se pliega sobre sí misma para enhebrarse dentro del anillo, formando una horquilla β . Las cadenas laterales aromáticas de Phe19 y Tyr20 traban la estructura impidiendo que el extremo C-terminal salga del anillo. Termolisina hidroliza las uniones entre Phe10 y Val11 y entre Gly12 e Ile13 obteniéndose un análogo de dos cadenas (MccJ25-Th19). Su estructura tridimensional determinada por RMN reveló que la región del anillo y de la cola C-terminal es idéntica a la de MccJ25. MccJ25-Th19 conserva la capacidad de inhibición de la RNA polimerasa en *E. coli* y de la respiración en *Salmonella*. En esta comunicación se presentan estudios de la interacción de MccJ25 y de MccJ25-Th19 con micelas mixtas de PC de yema de huevo (PC) y detergente (C12E10) y con capas monomoleculares de fosfolípidos. Los espectros de CD de los péptidos en la zona del UV-cercano pero no en la zona del lejano, realizados en presencia de micelas mixtas, presentan cambios que podrían interpretarse en términos de modificaciones en el micro-entorno de los aminoácidos aromáticos. Este resultado se correlaciona con los cambios observados en la fluorescencia intrínseca de los péptidos en presencia de las micelas y de SUV de PC. Los experimentos de monocapas revelaron que ambos análogos son capaces de penetrar en monocapas de PC y de fosfolípidos extraídos de *E. coli* a presiones comparables con las que existen en las membranas biológicas. Los resultados obtenidos indicarían que MccJ25 y MccJ25-Th19 interactúan con interfases fosfolipídicas de manera similar. Las tirosinas podrían estar involucradas en el proceso.

- 558. (7463) LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN UTILIZANDO DOMINIOS POLI-CISTEÍNAS.** ZANETTI, NATALIA; MAYORGA, LUIS S.

Lab. de Biología Celular y Molecular. IHEM-CONICET. Facultad de Cs. Médicas. UNCuyo. Mendoza.

Las proteínas para ser localizadas por microscopía de fluorescencia, deben ser unidas a anticuerpos acoplados a un fluorocromo o bien pueden ser fusionados a marcadores fácilmente detectables. Uno de los marcadores más utilizados es la

Green Fluorescent Protein (GFP). La principal desventaja que GFP presenta es que no puede ser detectada microscopía electrónica. Hasta el momento no se han desarrollado marcas que permitan el seguimiento de una proteína por microscopía electrónica de transmisión (TEM) así como se logró con la GFP para microscopía de fluorescencia. Con este propósito, se decidió fusionar una proteína de interés a una secuencia aminoacídica específica, que posea alta afinidad por metales pesados, formando un complejo electrón-denso detectable por TEM. Una secuencia con estas características son los dominios poli-cisteínas, que presentan alta afinidad por Cu(2+). Para determinar la efectividad de este nuevo dominio como marcador proteico para TEM, se sintetizó un péptido poli-cisteína, el cual fue unido a IgG purificada utilizando un agente químico específico y posteriormente el dominio fue saturado con Cu(2+). El complejo IgG-péptido-Cu(2+) formado fue endocitado por macrófagos J774 por 10 minutos a 37°C y luego las células fueron procesadas siguiendo un protocolo de TEM convencional evitando la tinción de la muestra con uranio y/o plomo. En cortes obtenidos de células incubadas con el complejo, se observó la presencia de marcas electrón-densas en el interior de vesículas periféricas que corresponderían al complejo IgG-péptido-Cu(2+). Estas marcas no se encontraron en otros compartimientos de las mismas células, ni tampoco en el control negativo. Los resultados obtenidos sugieren que este dominio poli-cisteínas permitiría localizar proteínas con alta resolución y especificidad por TEM, por su capacidad de formar complejos electrón-densos con metales pesados.

559. (7849) VISUALIZACIÓN DE INTERACCIONES ARN-ARN EN EL GENOMA DEL VIRUS DEL DENGUE POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA. PIETRASANTA, LÍA I.; ALVAREZ, DIEGO (2); LODEIRO, MARÍA F. (2); LUDUEÑA, SILVIO J.; GAMARNIK, ANDREA (2)

Centro de Microscopías Avanzadas, FCEyN-UBA; Fundación Instituto Leloir, FCEyN-UBA

La infección con el virus del dengue causa en el hombre la enfermedad más frecuente transmitida por mosquitos. Anualmente ocurren entre 50 y 100 millones de casos de fiebre por dengue, y entre 250.000 y 450.000 casos de fiebre hemorrágica por dengue en el mundo. Debido a los escasos conocimientos básicos sobre la biología de este virus, aún no se dispone de una vacuna ni de compuestos antivirales capaces de controlar esta enfermedad. Con el fin de estudiar los mecanismos de replicación del virus del dengue, estamos analizando la conformación del genoma del virus. Para esto empleamos microscopía de fuerza atómica (AFM) utilizando primero una molécula de ARN modelo de 2.2 kb que contiene los extremos del genoma viral. Estos estudios indicaron que dicha molécula es capaz de adquirir una conformación circular y que secuencias específicas presentes en el extremo 5' y 3' del genoma del virus median el contacto para la circularización. Empleando programas de predicción de plegado de los ARNs, métodos bioquímicos y mutagénesis dirigida, mapeamos dos regiones complementarias que son necesarias para la interacción. Dichas regiones forman parte de estructuras secundarias de ARN que son esenciales para la replicación viral. Para analizar si las interacciones ARN-ARN son suficientes para circularizar el genoma entero del virus del dengue, sintetizamos dicha molécula de 10,7 kb por transcripción in vitro y la visualizamos por AFM. El análisis de las imágenes reveló que esta molécula puede encontrarse en forma circular en ausencia de proteínas, indicando que la interacción ARN-ARN entre el extremo 5' y 3' del genoma es suficiente para mantener dicha conformación.

560. (7890) LOCALIZATION OF ORTHO-NITROPHENOL WITHIN THE LIPID BILAYER. TURINA, ANAHI DEL VALLE; SANCHEZ, JULIETA MARIA; PERILLO, MARIA ANGELICA

Depto. Química. F.C.E.F.y N.- U.N.C.Av. Velez Sarsfield 1611, 5016 Córdoba, Argentina.

ONP is the product of a β -galactosidase reaction catalyzed. Here we studied the localization of o-nitrophenol (ONP) within model membrane. This is relevant to understand the modulation of β -Gal through its binding to lipid-water interfaces (Sanchez & Perillo, *Biophys.Chem.* 99,281,2002). We measured: 1) the ability of ONP to quench the fluorescence emitted by DPH and TMA-DPH, which localize at different membrane depths, and 2) we studied the acid-base equilibrium of ONP in the presence and in the absence of PC MLVs and Triton X-100 (both electrostatically neutral interfaces), and compared these values with those obtained in solutions of dioxane of known dielectric constants (García & Perillo, *BBA*, 1324,76,1997). ONP quenched TMA-DPH more efficiently than DPH. (a lower concentration of quencher was necessary to reduce the initial fluorescence to a half). The Stern-Volmer plots corresponding to DPH showed a growing exponential behavior which was explained by an increase in the probability of quenching at high quencher concentrations. The delta pK of ONP ($pK_{water} - pK_{Triton} = 7.21 - 7.34 = -0.13$, nearly zero) was interpolated in a curve of delta pK vs the values of dielectric constant of the solutions of 20-80 %P/V dioxane used as solvents. The Dielectric Constant (DC) value DC=60 obtained reflected the polarity of the bilayers region where the ONP acid-base equilibrium was taking place and indicated a localization of ONP within the polar head group region of the membrane. With PC MLVs the delta pK fell outside the range of the experimental curve indicating a contribution of a dipolar potential (60 mV). Our results suggest that ONP (a weak hydrophobic substance) concentrates in the membrane respect to the aqueous phase through dipolar interactions with phospholipids polar head groups.

561. (7939) CAMBIOS EN LA TRANSFERENCIA DE ENERGIA DE FLUORESCENCIA DE LA MUTANTE BFP-PMCA-GFP ASOCIADOS A LA ACTIVACION DEL TRANSPORTADOR DE CA2+ DE MEMBRANA PLASMATICA HUMANA. CORRADI, GERARDO R.; ADAMO, HUGO P.

IQUIFIB-Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Fac. de Farmacia y Bioquímica (UBA-CONICET)

La PMCA es activada por unión de la calmodulina a un dominio de autoinhibición localizado en el extremo C-terminal de la molécula. Para estudiar los cambios conformacionales asociados con el proceso de autoinhibición y activación, utilizamos FRET (fluorescence resonance energy transfer) entre dos proteínas fluorescentes (BFP y GFP) fusionadas por ingeniería genética en el extremo N y C terminal de la PMCA (BFP-PMCA-GFP). La proteína de fusión se obtuvo por expresión en levaduras DBY2062, se solubilizó con 0.5% del detergente C12E10 y finalmente se purificó por afinidad en columnas de calmodulina sefarosa. Las muestras de proteína purificada se estabilizaron mediante la adición de fosfatidilcolina. Para el cálculo de la eficiencia de transferencia las medidas de FRET se llevaron a cabo excitando a 387 nm y midiendo la emisión de la BFP a 450 nm en la BFP-PMCA-GFP y en la BFP-PMCA. A partir de los valores de eficiencia de transferencia y un Ro para el par BFP-GFP de 45 angstroms, se estimó la distancia promedio (r) entre cromóforos. En presencia de Ca²⁺ 10 μ M el valor de r fue de 46.6 angstroms. La adición de calmodulina en cantidades suficientes para lograr la máxima activación (200 nM) produjo un aumento de r a 50 angstroms. El efecto de la calmodulina fue revertido por el agregado de 1.3 mM de EGTA. Los resultados obtenidos sugieren que la unión de calmodulina a su sitio en el extremo C-terminal induce un cambio conformacional discreto (distanciamiento de alrededor de 5 angstroms) que aleja o reorienta este segmento de la región central catalítica. En concordancia con esta hipótesis, el agregado de EGTA y el consecuente desprendimiento de la calmodulina, por reducción de la concentración de Ca²⁺ produce un aumento en la eficiencia de transferencia, que indicaría un acercamiento de los fluoróforos y la adopción de una conformación similar a la inicial.

562. (7988) ELECTRODINÁMICA DE LAS INTERACCIONES EN MEDIOS ELECTROLÍTICOS. POSIBLES CONSE-

CUENCIAS EN LAS FUNCIONES BIOLÓGICAS. DE XAMMAR ORO, JUAN R.; RUDERMAN, G.; GRIGERA, J.R. IFLYSIB (CONICET-UNLP-CIC)

Las interacciones eléctricas son de suma importancia en los sistemas biológicos. Mantienen estructuras y llevan a cabo procesos fisicoquímicos que hacen posible la vida. La estructura de proteínas, la función de las enzimas, el reconocimiento molecular, y otros procesos están dependiendo críticamente de cómo se comportan estas interacciones. Debido a su naturaleza de largo alcance es necesario efectuar un tratamiento cuidadoso, para computarse correctamente. Las interacciones eléctricas entre moléculas que poseen sitios cargados (parcial o total) y que se encuentran inmersas en soluciones electrolíticas, como es el caso de las moléculas biológicas en soluciones fisiológicas, no sólo dependen de la distancia entre las cargas interactuantes sino también de su dinámica, es decir la frecuencia con que ellas se mueven. Este hecho tiene importantes consecuencias para varios procesos biológicos, particularmente para los cinéticos. El estudio del apantallamiento que producen los iones de las soluciones fisiológicas sobre esos sitios cargados, incluyendo los efectos dinámicos, muestran que la interacción eléctrica puede resultar efectiva aún si las distancias son superiores a la de la longitud de Debye. Hemos mostrado que tales interacciones eléctricas se producen, en medios electrolíticos como los fisiológicos, si se cumple la condición que las cargas oscilen a frecuencias superiores a aproximadamente 250MHz. Para cada solución electrolítica, es posible definir una frecuencia umbral a partir de la cual cesa el apantallamiento y en consecuencia tiene lugar la interacción. Los autores son miembros de la Carrera del Investigador del CONICET y de la FCE de la UNLP.

563. (8036) DOMINIOS INVOLUCRADOS EN LA INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS QUE UNEN ÁCIDOS GRASOS (FABPS) Y MEMBRANAS FOSFOLIPÍDICAS. FRANCHINI, GISELA; FALOMIR, LISANDRO; CORSICO, BETINA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP). Fac. Cs. Médicas. UNLP

Las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) son proteínas citosólicas de bajo peso molecular (14-15 kD) involucradas en el transporte de ácidos grasos (FA). En enterocito se coexpresan FABP de intestino (IFABP) e hígado (LFABP). La razón por la cual un mismo tipo celular presenta dos tipos de FABPs aún no es conocida. Previamente hemos demostrado diferencias en la cinética de transferencia de FA desde estas proteínas hacia membranas. Con el objetivo de profundizar el análisis de las diferencias entre estas dos proteínas, en éste trabajo hemos analizado la interacción de I- y LFABP con membranas. Asimismo, empleando una serie de variantes estructurales (mutantes puntuales de lisinas de la región alfa-helicoidal, proteínas químicas I-/LFABP y una variante de IFABP carente de la región alfa-helicoidal (IFABP-HL)), hemos caracterizado dicha interacción. Se emplearon vesículas que poseen el reactivo fotoactivable ((125)I-TID-PC) en su composición. Las proteínas fueron incubadas con vesículas de diferente composición, fotoactivadas, sometidas a SDS-PAGE y autorradiografía. Hemos observado que la interacción de IFABP con vesículas es modulada por la carga de las membranasceptoras y la presencia del ligando, y que la región alfa-helicoidal juega un rol fundamental en dicha interacción. Las mutaciones individuales parecen no afectar significativamente la interacción de IFABP con membranas. Por otra parte ambas proteínas químicas mostraron una menor interacción con respecto a sus proteínas nativas, demostrando que la región alfa I es de gran importancia para la interacción de IFABP. Los resultados obtenidos demuestran que las interacciones electrostáticas participan en la interacción física de IFABP con membranas; y que la región alfa-helicoidal, en particular el segmento alfa-I, juega un papel fundamental en dicha interacción.

564. (8048) LIPOSOMAS: DENSIDAD DE CARGA SUPERFICIAL DE LÍPIDOS Y GRADO DE INTERACCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO. LASCANO, VALERIA; TAIRA, M. CRISTINA ; ALONSO-ROMANOWSKI, SILVIA

LBM, UNQ

Para una mejor comprensión de las estructuras complejas formadas por lípidos catiónicos y neutros con DNA, se realizó un análisis sistemático de las características de los mismos por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y por espectroscopia UV-visible. El bromuro de etidio es un fluoróforo cuya intensidad de emisión es aproximadamente 10 veces mayor cuando se intercala entre las bases del DNA. En sucesivos análisis electroforéticos de muestras provenientes de centrifugaciones isopícnicas que contenían ficoll, SDS, liposomas catiónicos EPC-DOPE-DOTAP y DNA plasmídico se observó reiteradamente una banda extra de bajo peso molecular. Para determinar la identidad de el/los compuestos correspondientes a dicha banda, se realizaron ensayos y se trató el gel con dos métodos de tinción distintos: bromuro de etidio y Sudán Black. Este último es un colorante específico para lípidos y lipoproteínas. Se encontró que el bromuro de etidio además del DNA interacciona con: liposomas catiónicos, ficoll y SDS. Paralelamente se evaluó la interacción entre el bromuro de etidio y lípidos de diferentes cargas, para determinar la dependencia de esta interacción con la carga superficial del liposoma. Mediante ensayos espectrofotométricos se completaron los estudios de interacción entre el fluoróforo y los liposomas catiónicos. Analizando los espectros obtenidos mediante la doble recíproca de absorbancia a diferentes concentraciones se determinó el coeficiente de reparto del bromuro de etidio entre fase acuosa y lipídica. Los resultados obtenidos aportan información útil a tener en cuenta cuando se analizan geles de agarosa con bromuro de etidio para sacar conclusiones en relación a los diferentes modelos de complejos liposomas/DNA ya que se ha observado que algunos tipos de lípidos presentan interacción con éste fluoróforo.

565. (8062) ATTENUATED TOTAL REFLECTION (ATR) IR SPECTROSCOPY AS A TOOL TO INVESTIGATE ORIENTATIONAL CHANGES AND LIGAND-INDUCED CONFORMATIONAL CHANGE IN PEPTIDE AND MEMBRANE PROTEINS. RUYSSCHAERT, JEAN-MARIE

CBSB-SFMB, Université Libre de Bruxelles; Université Libre de Bruxelles - Structure et Fonction des Membranes Biologiques - Centre de Biologie

Attenuated Total Reflection-IR spectroscopy (ATR-IR) is an experimental approach of special interest for the study of secondary structure, orientation and tertiary structural changes in peptides and membrane proteins. Multidrug resistance causes serious problems in the treatment of cancer and infectious diseases. Several proteins have been identified as responsible for cell resistance. They belong to the ATP-binding cassette superfamily and reject outside the cell a large number of molecules. Since rejection of drugs is responsible to a drastic diminution of their biological activity, it is urgent to know more about the mechanism responsible for this resistance. Resistance proteins have been purified and reconstituted into proteoliposomes. How the cytosolic and membrane domains participate in this structural rearrangement is unknown. Monitoring infrared linear dichroism spectra in the course of hydrogen/deuterium exchange allowed us to analyse conformational changes occurring in the membrane-domain. Tryptophane fluorescence quenching provides information about structural changes occurring in the cytosolic domains. Combining these 2 approaches allowed us to demonstrate that long range conformational changes are transmitted between the membrane-embedded and cytosolic domains and vice versa. These intermediate states were shown to be related to the capacity of drugs to accumulate in resistant cells. Binding of transported substrates to resistance proteins mediates a re-organization of

the membrane binding site but also of the cytosolic domains. ATP-binding and hydrolysis were shown to modify the conformation of the cytosolic domains and to enhance the accessibility of the membrane-embedded binding site to the aqueous medium. Resolution of the structure of the two kinds of organization would be a key step in an understanding of the resistance mechanism and the rational synthesis of drugs capable to kill resistant cells.

566. (8082) ORDENAMIENTO LIPÍDICO DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA Y SUS DOMINIOS RESISTENTES A DETERGENTE: ESTUDIOS EN ERITROCITOS BOVINOS. RODI, PABLO (1); CABEZA, MATÍAS (1); GENNARO, ANA (1,2)

INTEC (CONICET-UNL) y Depto. de Física, Fac. de Bioq. y Cs. Biológicas (UNL) (1) Depto. de Física Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas (UNL), (2) INTEC (CONICET-UNL)

En trabajos previos con membranas resistentes a detergente (DRM) de eritrocitos humanos (EH), obtenidas con Tritón X-100 (T) al 1%, observamos un ordenamiento aumentado de las cadenas acílicas en las vesículas de DRM y un aumento de esfingomielinina (SM) respecto de la membrana eritrocitaria original. En eritrocitos bovinos (EB), se conoce que la SM está muy aumentada respecto de EH, mientras que los contenidos de colesterol son similares. Objetivo: investigar ordenamiento lipídico de EB, y de sus DRM obtenidos con T. Métodos: Grado de orden de las cadenas acílicas por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) con los marcadores 5, 12 y 16 doxil ácido esteárico (SASL). Resultados: Eritrocitos intactos: los parámetros de orden S obtenidos por EPR dan mayores en EB respecto de EH ($p < 0.001$). DRM: los obtenidos con T 1% no mostraron diferencias significativas con el EB original, por lo que se realizaron extracciones con concentraciones mayores de detergente. La tabla muestra los valores medios ($n=3$) de S, con la sd entre paréntesis. Grado de significación: 1 $p < 0.02$, 2 $p < 0.01$, 3 $p < 0.001$ en comparación con EB. Se observa que únicamente los DRM extraídos con T4% presentan diferencias significativas con los EB a todas las profundidades de la bicapa lipídica. Resultados preliminares de TLC dan SM aumentada en DRM T4% respecto de EB.

	eritrocitos	DRM T1%	DRM T2%	DRM T3%	DRM T4%
S, 5 SASL	0.720 (3)	0.725 (4)	0.744 (4) ²	0.735 (6) ¹	0.740 (6) ²
S, 12 SASL	0.659 (7)	0.636 (22)	0.645 (12)	0.667 (43)	0.749 (11) ³
S, 16 SASL	0.276 (3)	0.280 (12)	0.285 (2) ¹	0.290 (5) ¹	0.303 (4) ³

El Triton X-100 solubiliza menos eficientemente EB que EH, lo que sugiere una mayor proporción de fase líquido ordenada (resistente a detergente) en EB. Esto refuerza las hipótesis del efecto ordenador de la SM.

567. (8119) ALPHA-SYNUCLEINA : A NATIVE UNFOLDED PROTEIN? FERNANDEZ, CLAUDIO O.; RASSIA, RODOLFO; BERTONCINI, CARLOS; HOYER, WOLFGANG; JARES-ERIJMAN, ELIZABETH; ZWECKSTETTER, MARKUZ; SUBRAMANIAM, VINOD; MARSH, DEREK; GRIESINGER, CHRISTIAN; JOVIN, THOMAS

LANAIS RMN 300, IQUIMEFA (CONICET), Argentina. Max Planck for Biophysical Chemistry, Goettingen, Alemania, Depto. Química Orgánica, FCEN (UBA), Argentina. Biophysical Group, University of Twente, Holanda

La fibrillogénesis o amiloidogénesis proteica es considerada la causa principal de algunos desórdenes neurodegenerativos con consecuencias fatales como son la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de priones. En particular, la fibrilación de la proteína alfa-synucleína aparece fuertemente involucrada en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. De acuerdo a estudios previos, la proteína presentaría en su estado nativo (monómero) una arreglo desordenado,

careciendo de elementos de estructura secundaria y de una conformación terciaria bien definida en solución. En nuestro grupo, hemos estudiado la interacción entre alfa-synucleína y Cu(II), así como con poliaminas naturales. Ambos constituyen factores fisiológicos que inducen notablemente la fibrilación de alfa-synucleína in vitro. Haciendo uso de Resonancia Magnética Nuclear y otras técnicas biofísicas hemos identificado las interfaces de unión para Cu(II) y espermina en alfa-synucleína, y caracterizado restricciones estructurales en la proteína que muestran claramente que la misma adopta una arquitectura global bien definida en solución. El estudio constituye el primer trabajo que identifica una interface para unión a metales en el dominio N-terminal de alfa-synucleína y que demuestra la existencia de interacciones moleculares entre dominios de la proteína. 1. Fernández CO, Hoyer W, Zweckstetter M, Jares-Erijman EA, Subramaniam V, Griesinger C, Jovin TM. EMBO J 2004; 23:2039-2046.

568. (8138) CARACTERIZACIÓN DEL FRAGMENTO PROTEOLÍTICO C-TERMINAL DEL DOMINIO EXTRACELULAR DE IA-2. PRIMO, M. EVANGELINA; SICA, M.P.; RISSO, V.A.; ERMACORA, MR; POSKUS, E

Cátedra de Inmunología (IDEHU-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires, Argentina

IA-2 es una proteína de 979 aminoácidos ubicada en membranas de gránulos secretores de tejido neuroendócrino. Su dominio intracelular (aa 601-979) presenta alta homología con los de la familia de tirosina fosfatasas, pero no presenta actividad enzimática. En cambio, el extracelular (IA-2ec: aa 35-576) no presenta homología con proteínas conocidas hasta el momento y no se conoce su forma de plegamiento. Además, se presume que IA-2ec es un receptor, pero no se le conoce ligando. Durante la maduración del gránulo, IA-2ec es digerido entre los aa 447-448 por convertasas específicas. Hasta el momento no se conoce el destino del fragmento N-terminal remanente (N-IA-2ec: aa 35-447). Nuestro objetivo fue determinar si el fragmento C-terminal del IA-2ec (C-IA-2ec: aa 449-576), que permanece anclado a la membrana celular, es un dominio de plegamiento autónomo. Para ello, se clonó el gen de C-IA-2ec fusionado a un hexapéptido de histidinas (C-IA-2ecH6). La proteína se expresó en E. coli en forma soluble (95%; 150 mg por litro de cultivo) y se purificó por IMAC y exclusión molecular (>99 %) en una concentración de ~4 mg/ml. Espectros de difracción circular en el UV lejano y cercano revelaron la presencia de estructura secundaria (predominantemente hélices alfa) y terciaria. Por cromatografía de exclusión molecular, observamos que C-IA-2ecH6 se encuentra en solución como una proteína globular monomérica de ~13 kDa. Además, en ensayos de proteólisis con tripsina en presencia y ausencia de urea 2M se observó que, en condiciones nativas, la proteína resiste la digestión. Los espectros de absorbancia, analizados por 4ta derivada, a diferentes temperaturas, se mantienen inalterados hasta ~40°C. Por lo tanto, creemos que C-IA-2ec es un dominio estructuralmente autónomo, capaz de cumplir el rol de un receptor celular

CARDIOVASCULAR, RESPIRATORIO Y RENAL 5

569. (6639) ACTIVIDAD DEL COTRANSPORTADOR SODIO/ GLUCOSA RENAL EN VESICULAS DE MEMBRANA LUMINAL DE CORTEZA RENAL DE RATAS DIABÉTICAS. ALBERTONI BORGHESE, M. FLORENCIA; ORTIZ, MARÍA; SPEZIALE, NORMA; GARCIA, JULIO; VIDAL, NORBERTO

Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)

Estudiamos la captación de a-metilglucosa (MG) en vesículas de membrana luminal (VML) de corteza renal de ratas Wistar macho adultas normales (N; n=6) y con diabetes experimental inducida por inyección intraperitoneal (i.p) de estreptozotocina

(STZ) (70 mg/kg) a los 7 (D7; n=4) y 14 (D14; n=4) días; y el entorno lipídico en el que se encuentra el SGLT en N (n=2) y D14 (n=2). Luego del sacrificio, se extrajeron los riñones, se diseccionaron las cortezas y se obtuvieron vesículas de membrana luminal mediante una técnica de centrifugación diferencial. Las VML se usaron luego para medir la captación de ^{14}C -a-metilglucosa durante 20 segundos frente a distintas concentraciones de MG fría y para determinar su composición fosfolipídica mediante una cromatografía en placa delgada y cuantificación de los fosfolípidos por el método de Fiske-Subarow. Resultados: V max: N=36.60±4.10, D7=20.53±8.12**, D14=28.60±6.72* (nmol/mg proteína/minuto). Km: N=3.48 ±1.03, D7= 6.54 ± 2.84*, D14= 5.75 ± 2.80 * (mM)* p<0.01 versus N ** p<0.001 versus N Perfil fosfolipídico (%): Esfingomielina: 27.48 vs 27.73 Fosfatidilcolina: 39.14 vs 37.63 Fosfatidilinositol: 4.44 vs 4.42 Fosfatidilserina 10.21 vs 9.86 Fosfatidiletanolamina 18.85 vs 20.31 N vs D14 respectivamente. Los resultados se expresaron como media±ES y se usó ANOVA para el análisis estadístico. Conclusiones: la modificación de la Km indica que en los animales con diabetes experimental el SGLT2 se encuentra inhibido. Dicha inhibición aparentemente no depende de cambios en la composición de los lípidos de la membrana en la que se haya el transportador. Nos parece importante esta comprobación ya que la bibliografía sobre ese aspecto muestra opiniones divididas. Hay que tener en cuenta que esta observación está realizada en un tiempo relativamente corto desde la inducción de la diabetes, es probable que con el correr del tiempo este posible mecanismo de compensación deje de operar.

570. (6960) EFECTOS DE LAS LIPOPROTEÍNAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B Y LINEAS CELULARES SAMPEDRO, MARIA CECILIA; FORCATO, DIEGO OSCAR; GRUPPI, ADRIANA; KIVATINITZ, SILVIA CLARA

CIQUIBIC- Fac Cs Químicas- UNC; Dpto de Química Biológica, Dpto de Bioquímica Clínica, Fac de Ciencias Químicas, UNC.

El ateroma contiene células musculares lisas y mononucleares en estado proliferante, componentes de la matriz extracelular y células espumosas. En la lesión temprana hay preponderancia de células T. El rol conocido de los linfocitos B es circunstancial. Las células Th1 aceleran la aterosclerosis, mientras que las células B protegerían contra la enfermedad inhibiendo el paso de Th0 a Th1 y produciendo autoanticuerpos. Por esto se estudió el efecto de lipoproteínas sobre células que participan en la respuesta inflamatoria, analizando los efectos sobre la proliferación y activación de los linfocitos B. Se aislaron lipoproteínas a partir de suero de donadores sanos. Las líneas de células B y las aisladas de bazo de ratón se cultivaron 24 y 48 hs en presencia de mitógenos y de diferentes lipoproteínas. Se analizó por citometría de flujo proliferación y viabilidad celular. VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) inhibe la proliferación de las células B sin estimular. Las distintas lipoproteínas afectaron diferencialmente la respuesta blastogénica de las células B inducida por LPS o ConA: LDL (lipoproteína de baja densidad) y VLDL la inhiben, HDL (lipoproteína de alta densidad) la aumenta. Cuando se estudió el efecto que produce la VLDL sobre un marcador de activación como el receptor de interleucina-2 se observó que esta aumenta significativamente su expresión. La LDL produce aumento de la apoptosis en la línea celular B madura A20 a diferentes tiempos de cultivo. Estas células no expresaron receptor de interleucina-2 en ninguna de las condiciones probadas. LDL no produce modificaciones observables en los parámetros de forma de la citometría de flujo de las células B inmaduras Wehi 231. Las otras lipoproteínas, HDL y VLDL, no afectaron la proliferación ni la viabilidad de las células maduras ni de las inmaduras. Es interesante que una lipoproteína aterogénica inhiba la proliferación de las células T, mientras que una antiaterogénica estimule la proliferación de las células B.

571. 7034 LA MONOAMINO OXIDASA RENAL MODULA LA RESPUESTA DIURÉTICA Y NATRIURÉTICA A LA EX-

PANSIÓN SALINA ISOTÓNICA. DE LUCA SAROBE, VERÓNICA; LEVIN, GLORIA; BARONTINI, MARTA; SCERBO, ADRIANA; ARRIZURIETA, ELVIRA; IBARRA, FERNADO

Instituto de Investigaciones Médicas A.Lanari, Fac Medicina, UBA; Centro de Investigaciones Endocrinológicas CEDIE, CONICET, Hospital de Niños R Gutierrez

La dopamina (DA) renal es una hormona diurética y natriurética sintetizada en los túbulos proximales del nefrón. Una de las enzimas que la degrada es la monoaminoxidasa (MAO). La inhibición de MAO en condiciones basales produce un aumento de DA que no se ve acompañado por natriuresis. Para profundizar el estudio de la relación MAO-DA-excreción hidroelectrolítica se estudiaron ratas Wistar macho adultas, las que tras un período de control recibieron una expansión de volumen del 5% del PC con solución salina isotónica durante 2 horas. La mitad de estos animales fueron tratados durante la expansión con un inhibidor de MAO (IMAO) Pargilina 20 mg/kg iv en bolo. A lo largo del estudio se obtuvieron muestras de orina para la determinación hidroelectrolítica y de catecolaminas y al finalizar se estudió actividad de MAO en corteza y médula renal. Al finalizar el estudio se observó en las ratas expandidas un aumento de diuresis (ml/15 min/100g) y natriuresis (mEq/15min/100g): 0.35±0.007 vs 0.744±0.12 y 0.005±0.001 vs 0.121±0.02 respectivamente, p<0.01 en ambos casos. Cuando las ratas recibieron IMAO la diuresis aumentó aún más, a 1.53±0.19 vs expansión, p<0.02 y la natriuresis a 0.21±0.03 vs expansión, p<0.05. La DA urinaria cambió con la expansión (ng/15 min/100g) de 5.76±0.56 a 9.76±1.04, p<0.01; con IMAO este incremento fue de 14.55±1.47, p<0.02 vs expansión. La actividad de MAO (nmol/mg tejido/h) fue: basal 7.66±0.52, post expansión 5.56±0.95 (NS) e indetectable post IMAO. Para determinar si el aumento en diuresis y natriuresis post IMAO son debidos a DA se administró al finalizar el estudio SCH 23390 (antagonista de receptores D1) 3 µg/kg y se observó una disminución del 40% en la diuresis y del 50% en natriuresis. La respuesta diurética y natriurética causada por la expansión isotónica moderada se incrementa al inhibir la actividad de MAO y es secundaria a un aumento de la disponibilidad de DA endógena renal que activa receptores tipo D1.

572. (7212) INFLUENCIA DEL GENERO SOBRE LA NEFROTOXICIDAD DEL ALUMINIO EN RATAS TRATADAS CRÓNICAMENTE CON LACTATO DE ALUMINIO (AL). MAHIEU, STELLA TERESITA; MILLEN, NÉSTOR ; GONZÁLEZ, MARCELA A.; CONTINI, MARÍA DEL CARMEN; ELÍAS, MARÍA MÓNICA(1)

Fisiología Humana. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral; (1) Farmacología. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

El objetivo de este trabajo fue examinar la posible diferencia de sexo en los efectos inducidos por el Al a nivel renal. Se trabajó con 4 grupos experimentales: controles machos (MC n=8) y hembras (HC n=8) y tratadas durante tres meses con lactato de Al (0,62 mg Al/ 100 g peso, v.ip, tres veces por semana) M+Al (n=9), H+Al (n=9). Se efectuaron balances (Ba) de agua y sodio, se estudiaron parámetros hemodinámicos y tubulares y vinculados al estrés oxidativo: contenido de glutatión (GSH), nivel de lipoperoxidación (LPO) y actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px). Solo en M+Al se observó en el Ba de agua un aumento de la diuresis con disminución de la osmolaridad. En H+Al se comprobó una reducción del BaNa, vinculado tanto a la disminución en la ingesta como al aumento en su excreción, mientras que en M+Al solo disminuyó el BaNa. El Al induce una reducción en la capacidad de concentrar la orina en ambos grupos: relación [U/P]osm MC 10,4±0,3; M+Al 7,5±0,2*; HC 10,2±0,4; H+Al 8,4±0,4* p<0.05. Los parámetros hemodinámicos muestran las diferencias de género conocidas, pero no son afectadas por el Al, como tampoco las EF% de agua y Na. En M+Al (no en H+Al)

el AI provoca daño oxidativo: LPO (nmol MDA/g tej hum) MC 233.1±9.6, M+AI 420.9 ±5.2*, HC 150.2 ±14.5, H+AI; 167.8 ±12 ;GSH (mol/g t.h) MC 2.4 ±0.1, M+AI 1.78 ± 0.1*, HC 2,4 ±0.1, H+AI 2.5 ±0.06 ; GSH-Px (nmol NADPH/min mg prot) MC 51.6 ±3.4, M+AI 22.5 ±0.9*, HC 47.9 ±1.1, H+AI 48.5 ±2.6.(p<0.05). Estos datos sugieren que el estradiol sería responsable de la resistencia del riñón al estrés oxidativo. No obstante no modificaría el efecto del AI sobre el metabolismo del sodio y la capacidad de concentración de la orina observado en ambos sexos.

573. (7661) COMPORTAMIENTO DE LA PRESION INTRA-ABDOMINAL DURANTE EL SHOCK. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN RATAS. OJEDA, JORGE A.; SOSA, LOMBARDO L.; LAZZERI, SILVIO E.; IMBELLONI, GUSTAVO A.; HUESPE GARDEL, LUIS A.

Catedra II De Fisiología Humana De La Facultad De Medicina. Universidad Nacional Del Nordeste

La cavidad abdominal es un compartimiento simple y cualquier cambio en el volumen de su contenido puede elevar la PIA (presión intra-abdominal). Nosotros hipotetizamos que la hipoperfusión esplácnica podría generar aumentos en la PIA. A tal efecto diseñamos un modelo experimental en ratas con el objetivo de examinar el comportamiento de la PIA durante el shock hipovolémico. El modelo se aplicó en 16 ratas inducidas al shock (Grupo I) y en 14 ratas utilizadas como control (Grupo II). En todos los casos se utilizó anestesia intraperitoneal; cateterización arterial para el monitoreo de la PAM (presión arterial media) y la medición de la PIA fue a través de un catéter intra-abdominal. Se realizaron mediciones basales de PIA y PAM; luego a las ratas del Grupo I se las indujo al shock hipovolémico (extracción del 30% de la volemia) y por el término de 60 minutos los parámetros enunciados fueron monitoreados. Se compararon los resultados obtenidos en ambos grupos al inicio del protocolo y al finalizar el mismo; luego las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron muestras de Pulmón, Hígado, Bazo, Riñón e Intestino Delgado para el estudio histopatológico. Para el análisis estadístico se utilizó la media, el desvío estándar y el test de Kruskal-Wallis considerando una diferencia estadísticamente significativa a un valor de p<0,05. La disminución de la PAM a valores de Shock produjo cambios significativos en la PIA. Se observó un aumento notable de la PIA en el Grupo I al cabo de los 60 minutos con respecto al Grupo II (2.2 ± 1 vs 14 ± 5 P: 0,000003). El estudio histopatológico reveló la presencia de edema importante en todos los órganos estudiados, fundamentalmente alrededor de la mucosa intestinal; ésto estaría indicando que el aumento de la PIA está relacionado con los cambios generados por la hipoperfusión esplácnica.

574. (7669) CONTRIBUCIÓN DE LA ACTH EN LA SECRECIÓN DE ALDOSTERONA EN RESPUESTA AL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO. PUEBLA, M; BENSI, N; BINOTTI, S; GAUNA, H.F.; NIEBYLSKI, A

UNRC. Ruta 36 km 601. Río Cuarto, Cba.; Dpto Biología Molecular.Fisiología Animal. UNRC

La secreción de ACTH durante el estrés agudo conduce a la liberación de glucocorticoides y aldosterona de la corteza adrenal. Este efecto es menor en el estrés crónico debido al feed-back negativo ejercido por los glucocorticoides. El objetivo fue investigar la participación de ACTH en la secreción de aldosterona en ratas con carga de sal y sometidas a estrés agudo y crónico por inmovilización (IMO). Se utilizaron 4 grupos de ratas Wistar macho adultas con acceso a una solución de NaCl 1.5% en la bebida: control (CC), control estrés (CE), control droga (CD) y estrés droga (ED). Se aplicó dexametasona (1mg/kg/ vía i.p.) en 2 dosis diarias como inhibidor de la secreción de ACTH. En los días 1 (estrés agudo) y 7 (estrés crónico), posterior a la IMO o 3 hs después de la i.p., se determinó la concentración de aldosterona y luego de 6 hs en jaulas metabólicas se midió la natriuresis. Los animales ED y CE excretaron menos Na⁺ que sus controles, (p=0.0002 y p=0.05 respectivamente). También la excreción fue

menor en el grupo CC que en el CD, (p= 0.00006), mientras que los animales ED excretaron más sodio que los CE, (p=0.0088). La aldosterona aumentó en el grupo CE tanto en el estrés agudo como crónico, (p=0.0088) y no hubo diferencias en los animales ED vs CD. Por otra parte, dicha hormona fue menor en el CD que en el CC, (p= 0.00007) y en el ED que en el CE, (p= 0.00007). La menor concentración de aldosterona en los animales con dexametasona, indicaría la participación de ACTH en la secreción de esta hormona en ratas con estrés y carga de sal. También se evidenció una menor antinatriuresis en el estrés crónico (38%) que en el estrés agudo (86%), indicando la posible adaptación de esta variable. La menor antinatriuresis en las ratas ED indicaría la participación de aldosterona en la respuesta renal al estrés, aunque no sería el único factor involucrado.

575. (7718) INFLUENCIA DEL ESTRÉS AGUDO Y LA SOBRECARGA SALINA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL EN RATAS. GARCÍA RODRÍGUEZ, E; PUEBLA, M; GAUNA, H.F.; BENSI, N; NIEBYLSKI, A

Dpto Biología Molecular. Fisiología Animal.UNRC. Ruta 36 Km 601. Río Cuarto.Cba.

Se ha demostrado en ratas con sobrecarga salina, que el estrés por inmovilización (IMO) produce una disminución en la excreción urinaria de sodio y agua, lo que conduciría a un incremento del volumen plasmático con el consecuente aumento de la presión arterial. El objetivo de este trabajo fue determinar la presión arterial en ratas con sobrecarga de sal en respuesta a un estrés agudo por IMO. Se trabajó con 4 grupos de ratas Wistar macho adultas en condiciones estándar de bioterio: control agua (CA), estrés agua (EA), control sal (CS), y estrés sal (ES). La carga salina se realizó adicionando un bebedero con solución NaCl 1.5% durante 3 días. El estrés se efectuó durante 2 hs. realizándose luego la inducción anestésica (ketamina HCL, 5mg/kg i.p.) y el registro de la presión arterial sistólica (TAS), diastólica (TAD) y media (TAM) por punción de la arteria carótida. La TAS mostró un aumento en los animales EA respecto a sus CA, (p= 0.05). Las ratas ES manifestaron un aumento respecto de los CS, (p= 0.009) y de los CA, (p= 0.006), siendo mayor el incremento en el grupo ES que en el EA, (p= 0.05). La TAD aumentó en el grupo ES respecto del CA, (p= 0.0076). La TAM aumentó en los animales ES respecto de los CS, (p= 0.04) y de los CA, (p= 0.002). El grupo EA, mostró una diferencia marginalmente significativa respecto a CA, (p= 0.078). La TAS aumentó aproximadamente un 14% en los animales estresados que consumieron agua y un 18% en los estresados con acceso a la sal, sin embargo este parámetro aumentó un 28% en los ES con respecto al grupo control agua. La misma tendencia se evidenció en la TAM. Esto nos indicaría que los cambios observados en la presión arterial son más acentuados cuando el estrés y la ingesta de sal se presentan conjuntamente, lo que podría ser consecuencia de un efecto sumativo de estas variables.

576. (7940) RADICALES LIBRES. RIESGO CARDIOVASCULAR Y VITAMINA E, EN RATAS CON ESTRÉS. BIANCO, M; BENSI, N; BINOTTI, S; GAUNA, H; SCOPPA, G; NIEBYLSKI, A

Fisiología Animal. UNRC, Río Cuarto, Cba

El estrés tiene una marcada influencia sobre la homeostasis energética y la producción de radicales libres, siendo conocida la acción oxidante de éstos sobre los lípidos séricos y los mecanismos homeostáticos. El objetivo fue investigar la posible acción protectora de la vitamina E en ratas sometidas a estrés, a través del perfil lipídico, el tiempo de coagulación y la fragilidad eritrocitaria. Se utilizaron ratas Wistar macho adultas divididas en dos grupos: 1) con aceite vegetal (A) y 2) con vit E (V) por vía oral durante seis semanas. Posteriormente cada grupo se dividió en controles (C) y estresados.(E) por inmovilización (IMO) 2 horas/ día durante 14 días. Se tomaron muestras de sangre post-estrés los días 1 y 14 para determinar resistencia globular máxima (RGMax) y mínima (RGMin), hematocrito (Hto), tiempo de coagulación (TC), colesterol total (CT), HDLcolesterol (HDL)

y LDL-colesterol (LDL). El TC fue menor en AE agudo que en su control; $p=0.003$. El grupo VE agudo mostró valores mayores que VC ($p=0.06$) y las ratas VE tuvieron un TC mayor que AE; $p=0.00009$. Los animales con estrés crónico presentaron un TC menor respecto a sus controles ($p=0.0002$ VC vs VE, AC vs AE $p=0.044$). La RGM_{max} fue mayor en las ratas con estrés y vitamina (VE vs VC $p=0.0007$). La RGM_{min} fue menor en AE que en AC, $p=0.02$, pero este parámetro fue mayor en VE que en VC $p=0.0002$. La HDL fue menor en los animales AE respecto a los AC $p=0.03$; mientras que fue mayor en VE que en VC ($p=0.02$) en el día 14. La relación LDL/HDL fue mayor en las ratas AE vs AC ($p=0.05$) siendo esta relación menor en VE que en VC ($p=0.05$) en el estrés crónico. Los valores totales de HDL y la relación LDL/HDL muestran un efecto protector de la administración crónica de vitamina E. El mismo efecto puede observarse con el TC en estrés agudo y en el crónico. La resistencia global parece ser mayor en los animales con vitamina. Estos parámetros en conjunto nos indicarían un posible efecto protector de la administración crónica de vitamina E.

577. (8049) VIAS DE FOSFORILACION DEL RECEPTOR DE RIANODINA (RYR2) DURANTE LA ESTIMULACION β -ADRENERGICA EN CORAZON PERFUNDIDO DE RATA. FERRERO, PAOLA; SAID, MATILDE; VITTONI, LETICIA; MUNDIÑA-WEILENMANN, CECILIA; MATTIAZZI, ALICIA

Centro De Investigaciones Cardiovasculares -Facultad De Ciencias Medicas (UNLP)

Ha sido demostrado que la actividad del canal liberador de Ca(2+) del retículo sarcoplasmático (RyR2) es modulada por fosforilación. El residuo Ser-2809, según lo descripto, es el sitio de fosforilación por PKA y CaMKII, y se ha observado que la estimulación β -adrenérgica incrementa la fosforilación de RyR2 en Ser-2809 en el corazón entero. Si bien ambas vías, tanto la de PKA como la de CaMKII son activadas en respuesta a agonistas β , aún no se conoce cuál de estas quinasas está involucrada en la fosforilación del sitio Ser-2809 de RyR2 ante el estímulo β -adrenérgico. Para estudiar este fenómeno, se perfundieron corazones de rata con isoproterenol (Iso) en ausencia y presencia de bajo Ca(2+) más nifedipina, para inhibir la vía de la CaMKII. El estado de fosforilación de RyR2 se estudió mediante el uso de anticuerpos contra el sitio fosforilado (PS2809-RyR2) y defosforilado (dePS2809-RyR2). El Iso incrementó la fosforilación $81.31 \pm 11.56\%$ respecto del control, mientras que en presencia de bajo Ca(2+), este incremento fue significativamente menor ($46.56 \pm 13.29\%$). La señal del dePS2809-RyR2 se redujo con Iso $67.1 \pm 6.23\%$ mientras que en presencia de bajo Ca(2+) cayó $50.31 \pm 6.44\%$ en relación al control. La misma maniobra también produjo una disminución significativa de la fosforilación del residuo Thr-17 de fosfolamban (sitio fosforilado por CaMKII) de $92.5 \pm 3.7\%$, en tanto que no alteró la fosforilación del sitio Ser-16 (fosforilado por PKA). Estos resultados muestran que la reducción en la concentración de Ca(2+) es capaz de disminuir la actividad de la CaMKII y que RyR2 es fosforilado en Ser-2809 por CaMKII y PKA en respuesta a estimulación β -adrenérgica.

578. (8066) PROGRESIÓN DE LA POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE (PQRAD) EN ETAPA TEMPRANA DE LA ENFERMEDAD. AZURMENDI, PABLO; FRAGA, ADRIANA; MUCHNIK, CAROLINA; GALAN, FELICITA; GUERRA, DANISA; ARRIZURIETA, ELVIRA; MARTIN, RODOLFO

Lab. de Nefrología Experimental, IIM A Lanari, Fac. de Med., U.B.A.; Hospital Universitario Austral, Universidad Austral, Pilar.

Estudios de nuestro laboratorio han demostrado un curso de deterioro progresivo y predecible de la función renal en PQRAD, cuando la creatinina plasmática (Cr[pl]) supera el valor de 2 mg/dl (etapa tardía). El análisis de esa progresión permitió calcular la edad del paciente a Cr[pl] de 2 mg/dl, la velocidad de progre-

sión (VdP) y la edad de comienzo de insuficiencia renal crónica terminal. Con el objeto de estudiar este mismo fenómeno en la fase temprana de la enfermedad, (Cr[pl] < 2 mg/dl) analizamos 41 pacientes con PQRAD entre los 42.4 ± 2.3 y 49.6 ± 2.3 años de edad. Se empleó la regresión de la $1/ Cr[pl]$ vs. edad, como estimación de la caída del filtrado glomerular. Se registró también la edad del diagnóstico (Edx) ecográfico. El análisis mostró que 26 pacientes, con un rango de Cr[pl] entre 1.0 ± 0.05 y 1.6 ± 0.05 mg/dl, evidenciaron correlación entre $1/ Cr[pl]$ y edad ($r = 0.70 \pm 0.4$, $P < 0.05$), con VdP de 6.4 ± 0.8 ml/min/año y edad de Cr[pl] de 2 mg/dl de 53.1 ± 3.0 años. Estos valores no fueron estadísticamente diferentes de los encontrados en la etapa tardía (7.4 ± 0.5 ml/min/año y 49.4 ± 1.2 años, N 94) La Edx se correlacionó con la edad a Cr[pl] de 2 mg/dl ($y = 10.58 + 1.25 * Edx$, $r = 0.78$, $P < 0.01$). Los datos sugieren que: 1) el análisis de la regresión en la etapa temprana permite predecir también la evolución de la enfermedad como en la etapa tardía y 2) la edad de diagnóstico ecográfico podría estimar el inicio de la etapa tardía. Índices más sofisticados serán necesarios para evaluar etapas donde el filtrado glomerular permanece aún inalterado.

CARDIOVASCULAR, RESPIRATORIO Y RENAL 6

579. (6614) CAMBIOS TEMPORALES DE ENTROPÍA LUEGO DE UN SÍNDROME CORONARIO AGUDO. VIGO, DANIEL E.; CARDINALI, DANIEL P.; NICOLA SIRI, LEONARDO; BERBARA, CARLOS; SAMPÓ, EDUARDO; PÉREZ DE LA HOZ, RICARDO; ORTIZ FRÁGOLA, ALBERTO; GUINJOAN, SALVADOR

Laboratorio de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA. Facultad de Bioingeniería, UNER. Depto. de Salud Mental y UCO Hospital de Clínicas, UBA.

Antecedentes: Los indicadores lineales y no lineales de Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca (VFC) permiten analizar la regulación autonómica del ritmo sinusal y son potentes predictores de mortalidad por enfermedad coronaria. Los indicadores lineales tienden a normalizarse en los meses posteriores a un síndrome coronario agudo. Con respecto a los indicadores no lineales, se comprobó que la correlación fractal (CoFr) no presenta modificaciones significativas en esta etapa. Sin embargo, no se ha estudiado el comportamiento de los índices que evalúan entropía (ApEn), lo cual cobra importancia ya que cuantifica un aspecto distinto del fenómeno no lineal. Objetivo: Analizar los cambios temporales de entropía luego de un síndrome coronario agudo. Material y Método: Se estudiaron 20 pacientes con síndrome coronario agudo (infarto agudo de miocardio o angor inestable de alto riesgo), 19 pacientes evaluados seis meses después de la internación y 20 controles sin patología cardiovascular. Se registró la duración del intervalo RR a lo largo de 10 minutos, analizando indicadores lineales y no lineales de VFC. Se compararon diferencias utilizando ANOVA factorial. Resultados: CoFr (media \pm DS): agudos: 1.04 ± 0.31 ; evolución: 1.05 ± 0.35 ; controles: 1.26 ± 0.23 . agudos vs evolución: $p = 0.938$; agudos vs controles: $p = 0.029$; evolución vs controles: $p = 0.037$. ApEn (media \pm DS): agudos: 1.19 ± 0.14 ; evolución: 1.08 ± 0.17 ; controles: 0.99 ± 0.19 ; agudos vs evolución: $p = 0.055$; agudos vs controles: $p = <0.001$; evolución vs controles: $p = 0.084$. Conclusión: A diferencia de la correlación fractal, la entropía en el grupo «evolución» presenta valores próximos a los del grupo «control». Este hecho refleja que las alteraciones de los distintos componentes no lineales de la regulación autonómica del ritmo sinusal evolucionan independientemente luego de un síndrome coronario agudo.

580. (6905) DISMINUCIÓN DE LA RELAJACIÓN DE ANILLOS AÓRTICOS PRE-INCUBADOS CON N-NITRO-L-ARGININA AL NITROPRUSIATO DE SODIO, OBTENIDOS DE RATAS PANCREATECTOMIZADAS. REYES TOSO, CARLOS FELIPE; LINARES, LAURA MERCEDES; RICCI,

CONRADO ROQUE; PINTO, JORGE ERNESTO B; PLANELLS, FERNANDO MIGUEL; RODRIGUEZ, RICARDO ROSENDO; CARDINALI, DANIEL PEDRO

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA. Paraguay 2155 Piso 7. Buenos Aires. Argentina

Estudios previos realizados en anillos aórticos sin endotelio, de ratas con pancreatectomía subtotal (Ppx) y pre-incubados con una solución conteniendo 44 mM de glucosa (GA), demuestran que poseen una menor capacidad de relajación al nitroprusiato de sodio (NPS) -dador de óxido nítrico- con respecto a anillos similares expuestos a un medio con glucosa normal (GN). Utilizando el mismo modelo se estudiaron in vitro los efectos de un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, la N-Nitro-L-Arginina (NNLA) sobre la relajación promovida por el NPS. Se colocaron anillos de aorta torácica en un baño para tejidos y luego de agregar al medio NNLA (10(-4) M) se registró la tensión isométrica desarrollada. A continuación se efectuaron curvas concentración-efecto acumulativas al NPS (rango -10(-10)-10(-5)M), en anillos procedentes de ratas No Ppx y Ppx. No se obtuvieron diferencias significativas en la relajación de los anillos de ratas No Ppx y en las Ppx incubadas en un medio con GN (n = 5). Por el contrario, los anillos de ratas Ppx colocados en un medio de GA relajaron menos que los Ppx en GN siendo este fenómeno significativo entre 10(-8) y 10(-6) (log M) (n = 5) (Ppx = 40,01 ± 2,70; 80,13 ± 2,58; 95,55 ± 1,48 vs Ppx glucosa = 22,42 ± 3,47; 49,73 ± 3,60; 81,35 ± 2,29) (p < 0.05). El agregado de melatonina (Mel) a 10(-5) M restauró la relajación en este grupo (n = 5) (Ppx + Glu + Mel = 41,84 ± 2,72; 78,10 ± 2,89; 92,98 ± 2,17 (p < 0.05). Las aortas de ratas con Ppx subtotal incubadas en un medio con GA con NNLA presentan una relajación disminuida al NPS con respecto a las Ppx colocadas en GN. Este fenómeno es revertido por el agregado de Mel al medio, probablemente debido a las propiedades neutralizantes de los radicales libres que presenta la hormona pineal.

581. (7069) EFECTO DE LA HIPOXIA HIPOBÁRICA CRÓNICA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA MTNOS DE CORAZÓN DE RATA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO. VALDEZ, LAURA BEATRIZ (1); ZAORBONYJ, TAMARA (1); LA PADULA, PABLO (2); COSTA, LIDIA ESTHER (2); BOVERIS, ALBERTO (1)

Lab de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Físicoquímica, Fac Farmacia y Bioquímica, UBA. (2) Instituto de Investigaciones Cardiológicas (ININCA-CONICET), Fac de Medicina, UBA.

La exposición crónica a bajas presiones de oxígeno produce un efecto cardioprotector. Se han correlacionado los niveles de NO con el mecanismo de adaptación a la hipoxia. El NO actúa como regulador de la respiración celular y mensajero intercelular; es sintetizado por diferentes óxido nítrico sintasas (NOS) las cuales catalizan la oxidación de la L-arginina y NADPH, para producir NO y L-citrulina. Las mitocondrias de corazón de rata producen NO, a través de una NOS constitutiva de la membrana interna (mtNOS). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la hipoxia hipobárica crónica (53.8 kPa) y del envejecimiento (2-18 meses) sobre la actividad de mtNOS de corazón de rata. La producción de NO por partículas submitocondriales de corazón fue 0.9±0.03 nmol/min.mg prot. La mtNOS cardíaca contribuyó con alrededor del 41% de la producción de NO celular total. La transición estado 4/estado 3 modificó la liberación de NO por mitocondrias acopladas de corazón, siendo 0.62±0.03 y 0.37±0.06 nmol/min.mg prot. para mitocondrias en estado 4 y 3 respectivamente. La expresión de la mtNOS se modificó selectivamente por la disponibilidad de oxígeno en condiciones hipobáricas: la actividad fue 20-60% mayor en ratas hipóxicas que en ratas controles, dependiendo de la edad. En contraste, las actividades de NADH-citocromo c reductasa y citocromo oxidasa no sufrieron modificaciones debido a la hipoxia. La actividad de la mtNOS de corazón de rata disminuyó 20% con la edad (2 a 18 meses), mientras que las actividades de NADH-

citocromo c reductasa y citocromo oxidasa fueron 36% y 12% menores. La mtNOS de corazón es una enzima mitocondrial altamente regulada por efectores fisiológicos, tales como la disponibilidad de oxígeno; a su vez, esta enzima, juega un papel regulador: los niveles de NO en estado estacionario modulan el consumo de oxígeno y la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno.

582. (7072) NOS MITOCONDRIAL DE CORAZÓN E HÍGADO DE RATAS LUEGO DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A LA ALTURA (4340 M) VALDEZ, LAURA BEATRIZ (1); ZAORBONYJ, TAMARA (1); GONZALES, GUSTAVO (2); CHUNG, FRANCISCO ARTURO (2); MIRANDA, SARA (2); BOVERIS, ALBERTO (1)

Lab de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Físicoquímica, Fac Farmacia y Bioquímica, UBA; (2) Ins. Investigaciones de la Altura, Fac Ciencias Filosofía, UPCH, Lima, Perú

Varios factores han sido involucrados en la protección cardíaca y adaptación a la altura; entre ellos, el NO. El NO se une a la citocromo oxidasa mitocondrial, aumentando la disponibilidad de oxígeno a los tejidos. Es biosintetizado por las NOS, las cuales catalizan la oxidación de L-arginina y NADPH por el oxígeno para dar L-citrulina y NO. Se ha reconocido la presencia de una NOS en la membrana interna mitocondrial (mtNOS), con un papel relevante en la fisiología y bioenergética mitocondrial. El objetivo del trabajo fue determinar la actividad de la mtNOS de corazón e hígado de ratas expuestas a la altura (en condiciones naturales) y correlacionar dicha actividad con los cambios de hematocrito y niveles de estradiol y testosterona. Ratas (macho) fueron divididas en 2 grupos: un grupo fue mantenido al nivel del mar (Lima) y otro fue transportado a Cerro de Pasco (4340 m; 61.3 kPa). Los animales fueron sacrificados a los 7, 14 y 21 días. Las ratas expuestas a la altura respondieron con un arresto en la ganancia de peso, e incrementaron el hematocrito y los niveles de testosterona. La altura aumentó significativamente la actividad de la mtNOS de corazón (58%). La actividad de la mtNOS de hígado y de la NOS citosólica de corazón no se modificaron. La exposición a la altura, modificó la contribución de la actividad de la mtNOS a la producción total de NO por este tejido: la actividad de mtNOS fue 80% de la producción de NO total en los animales de la altura y 55% en los animales que permanecieron al nivel del mar. La actividad de la mtNOS cardíaca mostró una correlación lineal con los valores de hematocrito y cuadrática con los niveles de estradiol y testosterona. El incremento en la producción de NO por mitocondrias de corazón podría ser esencial en el desarrollo de un efecto cardioprotector en la adaptación a la hipoxia. La mtNOS de corazón de rata podría estar regulada de manera opuesta por los niveles de hormonas sexuales.

583. (7382) LA ACTIVACIÓN DE LA PKC AL INICIO DE LA REPERFUSIÓN DISMINUYE EL TAMAÑO DE INFARTO EN ANIMALES NORMALES E HIPERCOLESTEROLÉMICOS SABÁN, MELINA; DONATO, MARTÍN; D'ANNUNZIO, VERÓNICA; GELPI, RICARDO J

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Es conocido que la proteína quinasa C (PKC) se activa durante la isquemia y permanece activada en la reperfusión. Sin embargo, el rol de esta enzima en los primeros minutos de la reperfusión no ha sido estudiado, particularmente su efecto sobre el infarto. Por otro lado, se ha sugerido que la hipercolesterolemia altera la activación de la PKC. Por lo tanto, el objetivo fue determinar si la activación de la PKC, al inicio de la reperfusión, disminuye el tamaño de infarto en corazones de animales normo e hipercolesterolémicos. Corazones aislados e isovolúmicos de conejo perfundidos según técnica de Langendorff, fueron sometidos a 30 min. de isquemia y 30 min. de reperfusión (G1). Se repitió G1 pero se administró PMA, un agonista específico de la PKC (G2), sólo los primeros 2 min de

la reperfusión. Estos protocolos fueron repetidos en corazones de animales hipercolesterolémicos: G3 y G4. Se evaluó la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI) (rigidez miocárdica) y el área de infarto utilizando TTC. Se determinó la concentración plasmática de colesterol. $X \pm \text{ESM}$; * $p < 0.05$ vs G1, # $p < 0.05$ vs G3. La concentración de colesterol en los animales normo e hipercolesterolémicos fue de 47.3 ± 9.3 y 340.1 ± 128.8 mg/dl, respectivamente ($p < 0.05$).

	G1, Basal (n=14)	G1, 30 min R	G2, Basal (n=8)	G2, 30 min R	G3, Basal (n=11)	G3, 30 min R	G4, Basal (n=5)	G4, 30 min R
PDVI (mmHg)	96.3±4.1	39.3±4.1	94.6±5.1	50.4±5.6	79.1±3.3	34.4±5.6	82.9±7.3	27.08±6.1
PDFVI (mmHg)	8.7±0.3	48.6±4.2	9.4±0.8	35.6±8.5	9.8±3.1	60.3±8.1	10.5±0.5	71.5±5.5
Infarto (%)		16.7±1.6		2.3±0.8*		31.9±3.1*		17.1±2.4#

La activación de la PKC, al inicio de la reperfusión, disminuye el tamaño de infarto en animales normo e hipercolesterolémicos, a pesar de que estos últimos presentan mayor área de infarto. Este efecto protector no involucra modificaciones en la función ventricular postisquémica.

584. (7487) EN ROEDORES, EL EFECTO DE LA OBESIDAD SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL DEPENDERÍA DE LA INTERACCIÓN LEPTINA-TRH. BURGUEÑO, ADRIANA L; LANDA, MARIA SILVINA; SCHUMAN, MARIANO L; ALVAREZ, AZUCENA; GEMA, CAROLINA; GARCÍA, SILVIA I; PIROLA, CARLOS J

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Fac de Medicina, UBA.

Diversos grupos han estudiado los mecanismos reguladores del apetito y el balance energético. Así, en la hipertensión inducida por obesidad la descarga simpática inducida por leptina juega un importante rol. Demostramos que la TRH diencefálica (TRHd) es hipertensora y que su acción es bloqueada por bloqueo simpático sugiriendo que su efecto presor estaría mediado por catecolami-nas. Sugerimos que en la obesidad la leptina aumentaría la TRHd y como consecuencia la PA, hipótesis que demostramos en ratas obesas hipertensas en las cuales el bloqueo de TRH fue capaz de normalizar la PA. Evaluamos el sistema de la TRH y la PA en 2 modelos de obesidad en ratón, los agouti (C57BL/6J-Ay) que sobreexpresan la proteína Agouti, inhibidora de receptores α -MSH y son hiperleptinémicos y los OB/OB que carecen del gen de leptina comparándolos con controles con normopeso (C57BL/6J). (Peso g: 46.3 ± 0.9 y 45.1 ± 1.2 vs 27.8 ± 1.0 respect, $p < 0.01$). Como esperá-bamos los OB/OB tuvieron niveles indetectables de leptina circulante y en contrario los Agouti mostraron un aumento significativo respecto al grupo control (ND, 2007 ± 222 vs 201 ± 52 , respect. $p < 0.01$). Acorde a la hipótesis, los OB/OB presentaron una PA y un contenido de TRHd disminuidos respecto al control con normopeso, en cambio los ratones hiperleptinémicos agouti, presentaron valores de PA significativamente ($p < 0.05$) elevados con respecto a sus controles acompañado de un aumento significativo de la TRHd ($p < 0.001$) (PA(mmHg): OB/OB 103 ± 2 , agouti 126 ± 2 vs black 112 ± 2 y TRHd (pg/mg prot): ob/ob 286 ± 68 , agouti 786 ± 116 vs black 443 ± 59 , $n=5$). No observamos alteraciones en los niveles de hormonas tiroideas en ninguno de los grupos. Estos resultados muestran que la elevación de la PA inducida por obesidad en roedores, sólo se observa en presencia de leptina y su receptor y que la TRH participa en forma independiente al eje tiroideo, probablemente modulando al sistema simpático.

585. (7499) EL SISTEMA DE LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROFINA (TRH) CARDÍACA EN LA HIPERTROFIA VENTRICULAR IZQUIERDA (HVI) EN LA RATA. SCHUMAN, MARIANO LUIS ; LANDA, MARIA SILVINA; BURGUEÑO, ADRIANA L; ALVAREZ, AZUCENA L; GEMA, CAROLINA ; PIROLA, CARLOS J; GARCÍA, SILVIA INÉS

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas, A. Lanari, Fac de Medicina, UBA.

Diversos genes se han involucrado en el desarrollo de HVI que forman parte de una larga lista. La capacidad de la TRH de aumentar la contractilidad cardíaca, llevaron a buscar el sistema de TRH en corazón de rata. En 1992, se demuestra la presencia de TRH, su mRNA y receptores en el corazón de rata. Hasta hoy solo se ha especulado acerca de su rol en corazón. Basados en sus propiedades tróficas sobre cultivos celulares y su efecto inotrópico positivo inyectada por vía intracardiaca en el corazón aislado de rata estudiamos su posible participación en el desarrollo de HVI. Estudiamos la expresión de TRH (RIA) y su precursor (ensayo de RPA) en tejido cardíaco de SHR a edad prehipertrofica (6w) vs adultos hipertrofos (18w) comparados a sus controles WKY ($n=8$). Los animales hipertrofos presentan un aumento de TRH en el ventrículo izquierdo (VI) de casi cinco veces respecto a los controles (2.5 ± 0.3 vs 0.5 ± 0.2 , $p < 0.05$), en igual sentido, el mRNA está casi 20 veces aumentado en este tejido con respecto al animal normal (11.2 ± 0.1 vs 0.5 ± 0.2 , $p < 0.04$) indicando un aumento de la síntesis del sistema de TRH en el VI. Por el contrario, en aurículas las SHR muestran una disminución de TRH y de su precursor vs sus controles (TRH: 0.8 ± 0.1 vs 3.5 ± 0.2 , $p < 0.05$ y mRNA: 0.05 ± 0.1 vs 0.12 ± 0.1 , $p < 0.04$ respect) que condice con una inactivación del sistema de la TRH auricular. No encontramos ningún cambio en septum y en ventrículo derecho en ningún grupo. Asimismo, estas diferencias solo se observaron entre las cepas a la edad adulta ya que a las 6 semanas no hay diferencias entre SHR y WKY indicando que la hiperactividad del sistema de la TRH observada en el estado hipertrofico no es sólo dependiente de la cepa sino que estaría relacionado al desarrollo de la patología. Los resultados muestran por primera vez, la participación de la TRH cardíaca en la HVI de la rata.

586. 7549 METABOLISMO DEL HEMO DURANTE EL DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN. CABALLERO, FABIANA; GUOLO, MARCELO; BATLLE, ALCIRA

Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porphirias (CIPYP), UBA - CONICET. batlle@mail.retina.ar

La hemo oxigenasa (HO) es la enzima reguladora del catabolismo del hemo. HO y monóxido de carbono (CO) participan en la homeostasis de las funciones cardiovasculares, incluyendo la regulación de la presión sanguínea (PA). Recientemente se ha demostrado que alteraciones en la actividad y/o expresión de la HO provocan variaciones de la PA en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). El objetivo de este trabajo ha sido investigar el metabolismo del hemo durante el desarrollo de la hipertensión (HTA). Se usaron ratas SHR machos jóvenes (8 semanas) y adultas (20 semanas) de la cepa Okamoto-Aoki (PA= 145 ± 4 y 175 ± 7 mmHg, respectivamente) y como controles ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) provenientes de Charles River Breeding Farm (Wilmington, Mass) (PA= 105 ± 5 mmHg). En ratas SHR jóvenes la actividad de la HO hepática disminuyó un 45% (V-WKY= 0.615 ± 0.031 U/mg) mientras que la de la 5-aminolevulinico sintetasa, se incrementó un 50% (V-WKY= 0.115 ± 0.023 U/mg), con respecto a los controles; las enzimas 5-aminolevulinico dehidrasa (ALA-D) y Deaminasa (PBG-D) en sangre no se alteraron, mientras que en hígado el ALA-D disminuyó un 30% (V-WKY= 16.2 ± 4.1 U/mg). En ratas SHR adultas las actividades enzimáticas fueron normales, excepto la del ALA-D que disminuyó un 40% en sangre (V-WKY= 0.17 ± 0.03 U/mlGR) y un 30% en hígado (V-WKY= 18.2 ± 5.2 U/mg). El índice de porfirinas plasmáticas aumentó 200% en ratas SHR jóvenes y fué normal en ratas SHR adultas. Por otro lado, a pesar que la excreción de porfirinas urinarias de 24 hs fue normal en SHR (V-WKY= $0-10 \mu\text{g}/24\text{hs}$), el patrón de porfirinas se modificó según la manifestaciones clínicas de la HTA en ratas jóvenes (27% uroporfirina, 65% coproporfirina) tendiendo a normalizarse con la HTA sostenida en ratas adultas (90% coproporfirina) (V-WKY= 95-100% coproporfirina). Las alteraciones observadas en el metabolismo del hemo podrían atribuirse a procesos involucrados en el desarrollo de la hipertensión y aportan más evidencias en cuanto al importante rol de la HO en la HTA.

587. (7628) LA PRODUCCIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO OCA-SIONA DAÑO ENDOTELIAL EN RATAS CON COARTA-

CIÓN AÓRTICA. POLIZIO, ARIEL HECTOR; GORZALCZANY, SUSANA; TAIRA, CARLOS; PEÑA, CLARA

Departamento de Química Biológica, IQUIFIB-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

La rata con coartación aórtica (Coa) es un modelo de hipertensión renovascular que manifiesta un centro de alta presión (aorta torácica) y otro de baja presión (aorta abdominal). Se sacrificaron ratas Wistar de 3 meses de edad sometidas a la ligadura aórtica durante 7 días y se les extrajo la aorta torácica y la abdominal. Otro grupo de animales se sometió a una operación simulada (Sham). Se midió la producción de anión superóxido mediante el ensayo de lucigenina. Los anillos se incubaron con DPI (inhibidor de la NADPH/NADH oxidasa), indometacina (inhibidor de la enzima prostaciclina sintetasa) y allopurinol (inhibidor de la xantina oxidasa). También se evaluaron las respuestas arteriales a distintos agentes vasodilatadores: acetilcolina (ACh) (respuesta dependiente de la integridad del endotelio), nitroprusiato (respuesta independiente de endotelio) y L-arginina (sustrato de la óxido nítrico sintetasa). La producción de anión superóxido en la aorta torácica de las Coa aumentó un 42% con respecto a la aorta torácica de las Sham. Este aumento fue inhibido un 82% con DPI y un 37% con indometacina. No se obtuvieron cambios en la producción de superóxido en la aorta abdominal de Coa con respecto a las Sham. La máxima respuesta vasorelajante de la ACh en la aorta torácica de las Coa disminuyó un 23% con respecto a la aorta torácica de las Sham. No hubo cambios significativos en los pD2 de la aorta torácica de las Coa tratadas con ACh o nitroprusiato. Para la L-arginina se obtuvo un pD2 de 6,19 mientras que las Sham no dieron respuesta, lo que podría deberse a una mayor actividad de la óxido nítrico sintetasa. Estos resultados demuestran que está aumentada la producción de anión superóxido en el centro de alta presión por activación de las enzimas NADPH-NADH oxidasa y prostaciclina sintetasa, lo que provocaría daño endotelial contribuyendo así al desarrollo de la hipertensión.

588. (7777) EXPRESION DE PEPTIDOS NATRIURETICOS Y CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LA HIPERTROFIA DE MIOCARDIO EN MODELOS COMBINADOS DE HIPERTENSION ARTERIAL. CAVALLERO, S (1); GONZALEZ, G (2); ROSON, M (1); PEREZ, S (2); PUYO, A (3); MORALES, C (2); DONOSO, A (3); EIDELSZTEIN, M (1); CANESSA, O (3); HERTIGO, C (4); GELPI, RJ (2); FERNANDEZ, BELISARIO (1)

Cát. de Fisiopatología, Fac. Farm. Bioq., UBA.; (2) Depto. Patología, Fac. Medicina, (3) Cát. Anatomía, Fac. Farm. Bioq., UBA. (4) INGEPI -CONICET.

Continuamos caracterizando la hipertrofia de miocardio (HM) en modelos de hipertensión arterial (HTA) renovascular (RV) y DOCA-sal (DS) asociados sucesivamente en secuencias diferentes. Estudiamos ratas SD con RV y DS de 2 y 4 semanas y combinados RV/DS y DS/RV y sus sham (Sh). La presión sistólica (PS) y el cociente peso corazón/corporal aumentaron en todos los grupos. El Nt-proANF plasmático (EIA) se comportó con un patrón similar al ANF en todos los grupos, con mayor incremento en DS/RV ($p < 0,01$). El ARNm (Northern Blot) de ANF en ventrículo izquierdo (VI) aumentó a las 4 semanas con valores superiores en los grupos DS (% sham, $n = 4-6$, RV4:562±72*, DS4:1007±72*#, RV/DS:1134±144*#, DS/RV:888±206*, * $p < 0,001$ vs Sh, # $p < 0,05$ vs RV4), sin cambios en la expresión de ARNm del BNP. El diámetro de los miocitos (DM, análisis de imágenes) aumentó en septum a las 4 semanas ($\mu\text{m} \pm \text{ES}$, $n = 4-5$, Sh:14,93±0,27; RV4:18,30±0,38*; DS4:18,05±0,16*, RV/DS:17,44±0,53*, DS/RV:17,22±0,25*, * $p < 0,05$ vs Sh), con similar perfil en pared libre de VI. El colágeno intersticial (CI, Picosirius Red) en septum mostró una tendencia al aumento en todos los grupos hipertensos de 4 semanas. El corazón endócrino respondió con perfiles de PS y secreción de ANF y ProANF similares en RV y DS. Mientras que en RV/DS no se modificó el perfil hormonal, en DS/RV aumentó la secreción de ANF y ProANF con

PS similar. El CI mostró estímulo de la fibrosis intersticial junto con el aumento del DM en los grupos de 4 semanas. El tratamiento DS solo o posterior a RV aumentó el ARNm de ANF respecto de RV4. La expresión de ANF sería indicador de la sobrecarga de volumen y los niveles de ANF y ProANF en DS/RV serían marcadores del tipo de remodelamiento. La HTA, la HM, la síntesis y secreción de péptidos natriuréticos y la fibrosis son procesos coexistentes expresados con perfiles propios.

ENDOCRINOLOGÍA 3

589. (6498) INTERACCIONES ENTRE AMPc, PGE2 Y LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (LHRH) EN EL HIPOTÁLAMO DE RATA MACHO. FERNÁNDEZ-SOLARI, JAVIER; PRESTIFILIPPO, JUAN PABLO; MOHN, CLAUDIA; DE LAURENTIIS, ANDREA; DE LA CAL, CAROLINA; RETTORI, VALERIA; MCCANN, SAMUEL M

CEFYBO-CONICET

La LHRH es un péptido hipotalámico responsable del comportamiento y la fisiología reproductiva. Es bien conocido que la prostaglandina E2 (PGE2) estimula la adenilato ciclasa (AC) con el consecuente aumento de AMPc y posterior liberación de LHRH hacia los vasos porta-hipofisarios. Además, se sabe que el GABA ejerce un tono inhibitorio sobre esta liberación. El objetivo del presente trabajo fue determinar si el AMPc y la PGE2 forman parte de la misma vía de liberación de LHRH o si constituyen 2 vías diferentes. Se realizaron incubaciones «in vitro» de explantes de hipotálamo medio basal (HMB) de ratas Wistar macho adultas durante 30 min en presencia de diferentes fármacos. LHRH, AMPc y PGE2 se midieron por RIA. Los resultados fueron analizados por ANOVA y post test de Newman-Keuls ó test t de Student, y expresados como la media \pm SEM. PGE2 (10(-7)M) aumentó significativamente la liberación de LHRH ($p < 0,001$, 27,7±2,6 pg/HMB) con respecto al control (6,5±0,5). SQ22536 (10(-4)M), un inhibidor de AC, bloqueó parcial pero significativamente ($p < 0,001$, 12,9±1,7) la liberación de LHRH estimulada por PGE2. Además, el mono-butiril AMPc disminuyó significativamente ($p < 0,01$) el contenido hipotalámico de PGE2 en las 3 concentraciones estudiadas (10(-3)M, 392,5±25,3 pg/HMB; 10(-4)M, 405,5±36,0; 10(-5)M, 328,7±85,4) con respecto al control (674,7±73,3). Por otro lado, LHRH (10(-9)M) disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la liberación de PGE2 (681,4±36,1 pg/HMB) con respecto al control (820,7±33,2), mientras que LHRH (10(-11)) aumentó significativamente ($p < 0,01$) el contenido de AMPc (957,6±117,5 fmoles/HMB) con respecto al control (574,0±19,6). Bicuculina (10(-4)M), un antagonista GABAérgico, incrementó significativamente ($p < 0,05$) tanto el contenido de PGE2 como de AMPc. PGE2 y AMPc representan 2 vías complementarias para la liberación de LHRH que se regularían mutuamente y se encuentran bajo un tono inhibitorio GABAérgico.

590. (6523) MANGANESO ESTIMULA LA LIBERACIÓN HIPOTALÁMICA DE LHRH EN RATAS MACHO. PRESTIFILIPPO, JUAN PABLO; FERNANDEZ-SOLARI, JAVIER; MOHN, CLAUDIA ESTER; DE LAURENTIIS, ANDREA; DE LA CAL, CAROLINA; DEES, LES; RETTORI, VALERIA

CEFYBO-CONICET. Veterinary Anat & Public Hlth, Texas A&M Univ, College Station, TX

El Manganeseo (Mn) es un metal de transición, esencial para el organismo. La exposición a concentraciones elevadas de Mn produce su acumulación en el SNC afectando principalmente al sistema dopaminérgico. Ha sido demostrado que el Mn afecta el funcionamiento del eje reproductor induciendo la pubertad precoz en ratas hembras. Dado que el eje reproductor se encuentra principalmente bajo control hipotalámico vía secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH), nuestro objetivo fue estudiar el efecto "in vitro" del Mn(+2) sobre la liberación de

la LHRH y mediadores implicados en su liberación. Se utilizaron hipotálamos medios basales (HMB) de ratas macho Sprague Dawley adultas (n=6-8) incubados en buffer Krebs Ringer bicarbonato en presencia de Mn(+2) 50 μ M y 500 μ M. Se determinaron DA por HPLC; LHRH, GMPc y PGE2 por RIA y la actividad de la NOS por el método de (¹⁴C)-Arginina. Los resultados fueron expresados como la MEDIA \pm SEM y analizados por ANOVA y Newman-Keuls test considerando $p < 0.05$ significativo. El Mn (500 μ M) incrementó la liberación de LHRH (C: 5.280.60 pg/HMB; Mn(+2) 500 μ M: 8.99 \pm 0.97 *** $p < 0.001$), la actividad de la NOS (C: 8.40 \pm 0.14 pmol NO/min/HMB; Mn(+2) 500 μ M: 9.22 \pm 0.22 * $p < 0.05$), el contenido de GMPc (C: 0.86 \pm 0.08 pmol/HMB; Mn(+2) 500 μ M: 1.34 \pm 0.11 ** $p < 0.01$) y la liberación de DA (C: 0.48 \pm 0.08 ng/ml; Mn(+2) 500 μ M: 1.17 \pm 0.08 ** $p < 0.01$) sin modificar el contenido de PGE2. Estos resultados indican que el Mn induce la liberación de LHRH y DA desde HMB. La liberación de LHRH estaría mediada por NO y GMPc.

591. (7160) MECANISMOS DEL ANTAGONISMO DE LEVONORGESTREL SOBRE TUMORES HIPOFISARIOS INDUCIDOS POR ESTROGENOS. REY-ROLDÁN, ESTELA BEATRIZ; PIROLI, GERARDO; GRILLO, CLAUDIA; PIETRANERA, LUCIANA; LIBERTUN, CARLOS; DE NICOLA, ALEJANDRO

Instituto de Biología Y Medicina Experimental; Bioquímica Humana, Facultad De Medicina, UBA

Previamente demostramos que el progestínico sintético levonorgestrel (LNG) antagoniza el desarrollo de prolactinomas inducidos por estrógenos en ratas macho Fisher. LNG presenta acciones androgénicas además de progestacionales, y los andrógenos inhiben la síntesis y secreción de prolactina (PRL) inducidas por estrógenos. Para dilucidar el mecanismo del antagonismo de LNG sobre prolactinomas inducidos por dietilestilbestrol (DES), estudiamos los efectos de LNG in vivo y en cultivos primarios de prolactinomas, en ausencia y presencia de bloqueantes de receptores progestínicos (RU486) y androgénicos (hidroxiflutamida, OH-FLU). LNG (10(-8), 10(-7) y 10(-6)M) disminuyó la secreción de PRL in vitro luego de 24 hs de incubación: 73 \pm 2; 68 \pm 2 y 60 \pm 6 % del control, respectivamente ($p < 0.05$). RU486 bloqueó el efecto inhibitorio de LNG10(-7)M de manera dosis-respuesta: LNG+RU486 (10(-7)M): 83 \pm 6, NS vs control y LNG+RU486 (10(-6)M) 92 \pm 3 ($p < 0.05$ vs LNG). En cambio, OH-FLU no tuvo efecto: LNG+ OH-FLU (10(-7)M) 71 \pm 3 y LNG+ OH-FLU (10(-6)M) 61 \pm 3, $p < 0.05$ vs control. In vivo, los tratamientos se efectuaron por 5 semanas mediante pellets subcutáneos, excepto para FLU que se inyectó diariamente. LNG (12mg) redujo tanto el aumento de peso hipofisario inducido por DES (20 mg): DES 23,9 \pm 1,5 mg/100g peso corporal, DES+LNG 15,3 \pm 1,2 ($p < 0,01$) como la PRL sérica: DES 416 \pm 34 ng/ml, DES+LNG 241 \pm 38 ($p < 0.01$). RU486 (40 mg) bloqueó esos efectos: DES+LNG+RU486 20,7 \pm 1,5 (peso) y 415 \pm 34 (PRL), NS ambos vs DES y $p < 0,05$ y $p < 0,01$ vs DES+LNG. FLU (10 mg diarios) no produjo cambios: DES+LNG+FLU 17,7 \pm 1,8 (peso) y 300 \pm 38 (PRL), $p < 0,01$ y $p < 0,05$ vs DES y NS ambos vs DES+LNG. Conclusión: el mecanismo inhibitorio de LNG sobre la proliferación de lactotropos y la hiperprolactinemia inducida por estrógenos sería mediado por los receptores progestínicos presentes en la hipófisis, indicando que al menos en esta glándula las acciones de LNG parecen ser exclusivamente progestínicas.

592. (7222) VARIACION CIRCADIANA DE LA EXPRESION DE LOS RECEPTORES DE OREXINAS DURANTE EL PROESTRO. SILVEYRA, PATRICIA (1); CATALANO, PAOLO (1,2); LUX-LANTOS, VICTORIA (1); LIBERTUN, CARLOS (1,2)

Conicet Instituto De Biología Y Medicina Experimental - (1); Universidad De Buenos Aires (2)

Las orexinas son neuropéptidos involucrados en el balance energético y el ciclo sueño / vigilia. Recientemente se demostró su interacción con en el eje reproductivo, principalmente por

estimular la liberación de GnRH hipotalámica in vitro. Las orexinas interaccionan con dos receptores acoplados a proteínas G, llamados OX1 y OX2, cuya expresión se informó en distintos tejidos como cerebro, hipotálamo, hipófisis, adrenales, ovario y testículo. Su patrón de expresión es influenciado por esteroides en hipófisis y adrenales. Aquí analizamos una posible relación de la expresión de OX1 y OX2 con los picos hormonales preovulatorios en ratas hembras de 60 días. Estas se decapitaron a las 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 22 y 23 hs del día de proestro; se extrajeron y congelaron hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio basal (HMB), hipófisis (Hf), bulbos olfatorios (BO) y corteza frontoparietal (CF). La expresión de OX1 y OX2 se determinó por RT-PCR, y los niveles de LH, FSH, PRL, estradiol y progesterona en suero por RIA. También se midió la ingesta diurna y nocturna. Observamos un aumento significativo de la expresión de OX1 en HA, HMB, Hf y BO durante la noche; no se hallaron diferencias día-noche en CF [RNAm OX1/ RNAm β -actina (UA): HA 17hs: 0.09 \pm 0.01, 22 hs: 0.25 \pm 0.01; HMB 17hs: 0.47 \pm 0.06, 23 hs: 0.88 \pm 0.09; Hf 17hs: 0.90 \pm 0.10, 23 hs: 2.40 \pm 0.50; BO 17hs: 0.10 \pm 0.01, 23 hs: 0.26 \pm 0.03; ($p < 0.05$); CF 17hs: 0.26 \pm 0.07, 23 hs: 0.24 \pm 0.09]. La expresión de OX2 fue paralela a OX1 en todos los tejidos. Se observaron los picos preovulatorios de gonadotropinas y esteroides propios de la cepa y la mayor ingesta durante la noche. Postulamos que los incrementos nocturnos diferenciales en la expresión de OX1 y OX2, entre CF y el resto de los tejidos, podrían asociarse a los patrones hormonales del proestro, y/o, al ciclo luz-oscuridad. (CONICET-UBA-ANPCYT)

593. (7362) EFECTO «IN VITRO» DEL DISRUPTOR ENDÓCRINO OMC (OCTYL- METHOXY-CINNAMATE) SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO DE RATAS MACHO. CARBONE, SILVIA; SZWARCFARB, BERTA; REYNOSO, ROXANA; PONZO, OSVALDO; BOLLERO, GABRIELA; MOGUILVSKY, JAIME; SCACCHI, PABLO

Laboratorio de Endocrinología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, U.B.A.

Los disruptores endocrinos son sustancias que interfieren en los mecanismos hormonales, modificando los procesos normales de reproducción y desarrollo. Presentan distintos mecanismos de acción, actúan a dosis muy bajas, tienen períodos de latencia de décadas y muchos de ellos son bioacumulativos. Comprenden sustancias que se utilizan en la preparación de productos de uso general: plaguicidas, plásticos, pinturas epoxi, filtros solares. En el presente trabajo se estudió el efecto del OMC (octyl-methoxy-cinnamate), sustancia usada como filtro solar en la preparación de cremas anti U.V. Se incubaron, en medio de Earle's, fragmentos de hipotálamo anterior y medio basal de ratas macho adultas enteras y castradas (n = 10). Luego de un período de estabilización y descarte, se midió la liberación basal durante 30 min. y posteriormente se adicionó OMC 10 (-7) M al medio de incubación en ambos grupos y solución salina a los respectivos controles, prosiguiendo la incubación durante 60 min. Se determinó la liberación de Gn-RH por método de RIA y de aminoácidos neurotransmisores por HPLC. El OMC disminuyó significativamente ($p < 0.001$) la liberación de Gn-RH (expresada en % respecto al basal) en animales enteros (129 \pm 17 vs. 73 \pm 4), no observándose cambios en los animales castrados (103 \pm 14 vs. 87 \pm 24). Dicha modificación se correlaciona con aumento significativo ($p < 0.001$) en la liberación hipotalámica (pm/100 μ l de medio) del aminoácido inhibitorio GABA (558 \pm 81 vs. 1327 \pm 161) y disminución ($p < 0.001$) en la liberación del aminoácido excitatorio glutamato (1094 \pm 163 vs. 507 \pm 65), en animales enteros. Estos resultados indicarían que el OMC ejercería un efecto inhibitorio sobre la liberación de Gn-RH, estimulando la liberación de GABA y disminuyendo el glutamato. Estos cambios podrían ser modulados por la presencia de esteroides, dado que no se observan en los animales gonadectomizados.

594. (7389) EL 17 β -ESTRADIOL MODIFICA LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ÓXIDO NÍTRICO, LA GUANILIL

CICLASA SOLUBLE (SGC), EN ADENOHIPÓFISIS CABILLA, JIMENA; DÍAZ, MARÍA DEL CARMEN; LASAGA, MERCEDES; DUVILANSKI, BEATRIZ

Departamento de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Previamente demostramos que el tratamiento con E2 disrumpe el efecto inhibitorio del NO sobre la liberación de prolactina en adenohipófisis, afectando la actividad de la sGC. Diversas evidencias indican que los estrógenos E2 modifican la actividad de la sGC en diferentes tejidos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los E2 (endógenos y exógenos) sobre la expresión de la sGC en adenohipófisis de ratas hembras prepúberes y adultas de la cepa Wistar. Se cuantificó la expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ de sGC por Western blot en adultas durante el ciclo estral y en pseudomenopausia (ovariectomía, OVX) u OVX con reemplazo hormonal (cápsulas con E2). Durante el ciclo estral, la expresión de $\alpha 1$ disminuyó en proestro (P) con respecto a los niveles en estro (E) y diestro (D) (unidades relativas, P: 0.65*, E: 0.97, D: 1.16, $p < 0.05$ vs E y D) y los niveles de $\beta 1$ aumentaron en P y E respecto al D (P: 1.03**, E: 1.03**, D: 0.72, $p < 0.01$ vs D). La OVX disminuyó la expresión de ambas subunidades (% del control (C), $\alpha 1$: 70%, $\beta 1$: 80%) mientras que el reemplazo con E2 aumentó la expresión de $\alpha 1$ a los 4 y 7 días (% del C, E2 4 d: 160%, E2 7 d: 165%) y disminuyó los niveles de $\beta 1$ a los 7 días (E2 7 d: 70%). El efecto agudo del E2 se evaluó en prepúberes de 21 días (inyección sc 40 μ g E2/kg). La expresión de $\alpha 1$ fue máxima a las 9 h post-inyección (% del C, 9 h: 180**, $p < 0.01$ vs C) mientras que los niveles de $\beta 1$ disminuyeron a partir de las 6 h (6 h: 70**, 9 h: 75**, $p < 0.01$ vs C). 17 α -E2 y otros esteroides no afectaron la expresión de sGC. Estos resultados muestran que el E2 ejerce una acción opuesta sobre la expresión de ambas subunidades de la sGC y dicho efecto es específico del 17 β -E2. Dado que ambas subunidades son igualmente requeridas para formar la enzima activa, la disminución en la expresión de $\beta 1$ podría explicar la baja actividad de sGC registrada previamente en ratas OVX-E2.

595. (7444) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DEL RECEPTOR GABA(B) HIPOFISARIO POR GABA Y ESTEROIDES SEXUALES. BIANCHI, MARÍA SILVIA (1); BONAVENTURA, MARÍA (1); BETTLER, BERNHARD (3); LIBERTUN, CARLOS (1,2); LUX-LANTOS, VICTORIA (1)

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET (1); Universidad de Buenos Aires (2); Universidad de Basilea, Suiza (3)

Previamente describimos la expresión hipofisaria de las subunidades del receptor GABA(B), RGABA(B1) y RGABA(B2). Estas son decrecientes a lo largo del desarrollo y mayores en hembras que en machos en etapas tempranas. Su expresión dependía de testosterona (T), pues el tratamiento con T disminuyó RGABA(B1) en hembras mientras que Flutamida, antiandrógeno, en los días E17-E22, más castración neonatal incrementó RGABA(B1) en machos. Además GABA hipotalámico variaba paralelamente a los niveles de RGABA(B1) hipofisario. Aquí estudiamos el efecto de GABA (1.10-4M), T (1.10-7M), dihidrotestosterona (DHT: 1.10-7M) y estradiol (E2: 1.10-7M) sobre la expresión de RGABA(B1) y RGABA(B2) en cultivos de hipófisis de machos (CHM) y hembras (CHH) de 6 días de edad, luego de 72 h de estímulo. La expresión del receptor se midió por RT-PCR semicuantitativa, y LH, FSH y PRL en el medio por RIA. GABA aumentó RGABA(B1) sólo en CHH [RNAm RGABA(B1)/ β -actina (UA): hembras-control: 0.43 \pm 0.04 vs hembras-GABA: 1.08 \pm 0.05, $p < 0.01$; machos-control: 0.45 \pm 0.14 vs machos-GABA: 0.59 \pm 0.05, ns]. El aumento inducido por GABA en RNAm RGABA(B1) fue revertido parcialmente por antagonistas GABA(A) y GABA(B). GABA inhibió PRL, pero no LH o FSH, en CHM y CHH. E2, T y DHT no modificaron el RNAm RGABA(B1) en CHM y CHH, mientras que T y DHT aumentaron

el RNAm RGABA(B2) [RNAm RGABA(B2)/ β -actina (UA): hembras-control: 0.80 \pm 0.12, hembras-T: 1.40 \pm 0.09, hembras-DHT: 1.74 \pm 0.24, machos-control: 1.09 \pm 0.04, machos-T: 1.56 \pm 0.11, machos-DHT: 1.41 \pm 0.11, ANOVA-dos sentidos: interacción: ns, efecto principal tratamientos: $p < 0.02$]. E2, pero no T ni DHT, aumentó PRL en CHM y CHH. T y DHT aumentaron FSH en CMH y CHH. E2, T y DHT inhiben LH en CHM y tienden a inhibir en CHH. Concluimos que la expresión de las subunidades del RGABA(B) hipofisario están diferencialmente reguladas por GABA y por esteroides sexuales. (CONICET, UBA, ANPCYT).

596. (7481) EL ÓXIDO NÍTRICO INDUCE ESTRÉS OXIDATIVO Y AUMENTA EL POTENCIAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS. MACHIAVELLI, LETICIA; POLIANDRI, ARIEL; QUINTEROS, FERNANDA; DUVILANSKI, BEATRIZ

Departamento de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la exposición prolongada al óxido nítrico (NO) induce apoptosis en células adenohipofisarias en cultivo. El NO puede ejercer dicho efecto a través de diversas vías, varias de las cuales incluyen como paso inicial la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). El objetivo de este trabajo fue estudiar si el estrés oxidativo está involucrado en el efecto apoptótico del NO. Se utilizaron cultivos de células adenohipofisarias de ratas machos jóvenes adultas de la cepa Wistar y DETANONOate 1 mM (DETA/NO) como dador de NO. El TROLOX, un agente antioxidante, revirtió el efecto citotóxico del NO (medida de la actividad celular por MTT, Abs 600 nm; Control: 0.464 \pm 0.013, DETA/NO 48 h: 0.372 \pm 0.004 $p < 0.001$ vs. Control, TROLOX 1 mM 48 h: 0.498 \pm 0.015, DETA/NO + TROLOX 48 h: 0.455 \pm 0.017 $p < 0.001$ vs. DETA/NO). El NO causó un aumento rápido de la producción de ROS (medida a través de la oxidación de la sonda DHR123 por Citometría de Flujo; % del Control; DETA/NO 0.5 h: 212.1 \pm 0.3, 1 h: 250.9 \pm 0.3, 3 h: 137.1 \pm 0.2, 6 h: 161.9 \pm 0.2, en todos los casos $p < 0.001$ vs. Control). El NO aumentó el potencial de la membrana mitocondrial interna en función del tiempo (medido por Citometría de Flujo utilizando la sonda DiOC[6]; % del Control; DETA/NO 1 h: 137.5 \pm 0.4, 3 h: 202.9 \pm 0.6, 6 h: 258.8 \pm 0.7, 12 h: 292.1 \pm 0.7, en todos los casos $p < 0.001$ vs. Control). Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo sería un evento temprano disparado por el NO e intervendría en el efecto citotóxico del mismo ya que dicho efecto puede ser revertido por antioxidantes. Las ROS podrían ser las mediadoras del incremento del potencial de la membrana mitocondrial inducido por el NO.

597. (7564) LA ACTIVACION DE LOS RECEPTORES DE PROGESTERONA PROTEGE DE LA ACCION DEL ESTRADIOL SOBRE LA APOPTOSIS DE SOMATOTROPOS INDUCIDA POR EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF). ZALDIVAR, VERONICA; CANDOLFI, MARIANELA; ZARATE, SANDRA; JAITA, GABRIELA; FERRARI, LUCIANA; PISERA, DANIEL; SEILICOVICH, ADRIANA

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA

Nuestros resultados previos indicaron que la progesterona revierte el efecto permisivo de los estrógenos en la apoptosis inducida por TNF en células adenohipofisarias. En el presente trabajo hemos determinado la especificidad de acción del estradiol y la progesterona en la apoptosis (por TUNEL) de somatotropos (identificados por ICQ) de ratas hembras ovariectomizadas. El 17 β -estradiol indujo apoptosis de somatotropos y los sensibilizó a la acción proapoptótica del TNF (C: 3.7%; TNF: 1.6; E2: 10.0, $p < 0.001$; E2+TNF: 18.0%, $p < 0.001$, χ^2). Estos efectos fueron completamente bloqueados por ICI 182 780 (10-6M), un antagonista del receptor de estrógenos (E2+ICI: 1.5%; E2+ICI+TNF: 2.3). La progesterona disminuyó

parcialmente el efecto proapoptótico del estradiol e inhibió la apoptosis de somatotropos por TNF (E: 7.0 %; E+TNF: 12.2; E+P: 4.0; E+P+TNF: 1.8, $p < 0.01$). ZK 98299 (10-6M), antagonista de receptores de progesterona, revirtió completamente la acción protectora de la progesterona sobre la apoptosis inducida por TNF en presencia de 17β -estradiol (E+TNF: 6.2%; E+TNF+ZK: 6.3; E+P+TNF: 1.5; E+P+TNF+ZK: 4.9, $p < 0.01$). Dado que tanto la progesterona como el ZK interactúan con el receptor para glucocorticoides, investigamos el efecto de dexametasona 10-6M en la apoptosis de somatotropos. Dexametasona per se no afectó el porcentaje de células TUNEL+, ni modificó la acción proapoptótica de TNF en células cultivadas con 17β -estradiol. Estos resultados sugieren que el estradiol no sólo sensibiliza a las células adenohipofisarias a factores proapoptóticos como el TNF, sino que también induce por sí mismo apoptosis de somatotropos. La progesterona a través de sus receptores protege a estas células de la apoptosis inducida por el TNF.

598. (7613) PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS TIROSINA KINASAS EN LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR INDUCIDA POR DESPOLARIZACIÓN EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS. VELA, JORGE MARCIAL; SUÁREZ, CECILIA ; BECÚ-VILLALOBOS, DAMASIA; DÍAZ TORGA, GRACIELA

IByME-CONICET

Las células hipofisarias son excitables, tienen actividad eléctrica espontánea y expresan en membrana canales de calcio voltaje dependientes, preferentemente del tipo L. Ha sido ampliamente estudiado que la actividad de los canales de calcio tipo L puede ser regulada por diversas proteínas kinasas tales como PKA y PKC. Estas dos kinasas fosforilan residuos en ser y treo de las subunidades alfa y beta de estos canales. Más recientemente ha cobrado interés la participación de tirosina kinasas (TK) y receptores TK (RTK) en la regulación de canales de membrana voltaje dependientes en diversos tejidos, pero poco se sabe acerca de su participación en la movilización de calcio en células hipofisarias y éste es el objetivo de nuestro trabajo. Se midió segundo a segundo el calcio intracelular por espectrofluorimetría (método de Fura 2AM), en células adenohipofisarias en suspensión. Tanto la genisteína como la herbimicina (inhibidores de TKs) inhibieron significativamente la entrada de calcio extracelular inducida por una concentración depolarizante de K^+ 12.5 mM (área bajo la curva: genist 25uM: 5170+166, herbim 10uM :4616+67 vs buffer: 6121+308, $p < 0.01$). El estímulo de RTKs con los factores de crecimiento IGF, EGF, VEGF, FGF2 y TGFbeta no modificó la $[Ca^{2+}]_i$ basal ni el influjo de calcio inducido por K^+ . Un inhibidor específico de la c-Src, el PP1, no tuvo efecto sobre la despolarización inducida por K^+ . El ácido okadaico, un inhibidor de fosfatasa tipo I y IIa, no modificó el influjo de Ca^{2+} por despolarización de membrana. Estos resultados demuestran por primera vez la participación de TKs, probablemente no receptoras, en la activación de canales de membrana voltaje dependientes en células adenohipofisarias. Con el apoyo de ANPCYT, CONICET y Beca Ramón Carrillo.

599. (7646) REGULACION DE LA EXPRESION DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) POR PROGESTERONA (PROG) EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE MOTONEURONA. GONZALEZ DENISELLE, MARIA CLAUDIA ; GARAY, LAURA; GONZALEZ, SUSANA; ROIG, PAULINA; LIMA, ANALIA; DE NICOLA, ALEJANDRO F.

IByME y Depto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

La PROG ejerce efectos neuroprotectores en la injuria y degeneración del sistema nervioso central y periférico. La similitud en las acciones del BDNF y PROG sugieren que la neurotrofina podría estar involucrada en la neuroprotección hormonal. Previamente observamos efectos protectores de PROG a nivel

morfológico, molecular y funcional en la médula espinal del Wobbler (Wr), modelo murino de degeneración de motoneurona. En el presente trabajo empleamos hibridación in situ para analizar la expresión del ARNm de BDNF en Wr. Se trataron animales en los estadios iniciales de la enfermedad con PROG (pellet s.c. de 20 mg x 60 días). Los niveles séricos de PROG (RIA) se elevaron en Wr (75.73 ± 15.37 ng/ml) y en controles tratados (CTL: 17.85 ± 1.27). Las neuronas del asta ventral se clasificaron de acuerdo al tamaño en menores y mayores de $600 \mu m^2$, a fin de detectar las motoneuronas afectadas por la degeneración. Por análisis de imágenes computarizado, el no. de granos por unidad de área ($100 \mu m^2$) en Wr disminuyó un 60% tanto en $< 600 \mu m^2$ (9.0 ± 1.31 vs CTL 30.0 ± 2 , $p < 0.01$) como en $> 600 \mu m^2$ (12.16 ± 1.51 vs. CTL 22.36 ± 0.72 , $p < 0.01$). En Wr tratados con PROG, aumentó 1.8 X la densidad de granos en $< 600 \mu m^2$ (22.15 ± 2.0 , $p < 0.05$ vs no tratados) y 1.9 X en neuronas $> 600 \mu m^2$ (17.27 ± 1.96 , $p < 0.05$ vs. no tratados). Asimismo, estudiamos la actividad de la colina acetiltransferasa – enzima estrechamente relacionada al BDNF - en terminales nerviosas del bíceps. Los bíceps de Wr mostraron disminución del 55.3% de la actividad respecto a CTL ($p < 0.001$), mientras que el tratamiento con PROG produjo un leve pero significativo aumento ($p < 0.05$). Los datos obtenidos sugieren que en la neurodegeneración el BDNF podría actuar como intermediario de las acciones neuroprotectoras de PROG, en coincidencia con lo observado anteriormente en la injuria de la médula espinal.

600. (7675) EFECTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (RHGH) SOBRE LA ABSORCIÓN/SÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAG) POR EL INTESTINO DE LA RATA. INCHAUSPE, GABRIEL; RIGALLI, ALFREDO; PUCHE, RODOLFO C.

Facultad de Cs. Médicas, Rosario; Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.Rosario

La administración de rhGH a ratas hembra produce un aumento transitorio de TAG pasmáticos. Ratas hembras de 220-250 g de peso recibieron 1 ug de rhGH por vía endovenosa, que produce una concentración inicial en plasma de aproximadamente $100 \mu g.L^{-1}$ de la hormona. Desaparece del plasma con $t_{1/2} = 16 \pm 1.5$ minutos. En ratas intactas los TAG aumentan exponencialmente con un pico hacia las 3ª. hora. La concentración de glicerol libre no sufrió modificaciones (Basal = 0.017 ± 0.002 (n = 9), post-rhGH = 0.017 ± 0.001 g.L⁻¹, n=39). Los TAG aumentaron en el conducto torácico y el perispleno de una fracción del intestino aislado in situ. El aumento de TAG no se modifica por ligadura de la vena porta y tronco celiaco. A continuación se indican los valores iniciales de TAG (\pm ES) y la constante de tiempo (\pm ES). Esta última no mostró diferencias significativas entre modelos (ANOVA, P = 0.530). Modelo experimental, Fluído, N, TAG Inicio, g.L⁻¹(-1), Constante, min(-1) Rata intacta, Plasma, 6, 0.12 ± 0.05 , 0.0115 ± 0.0025 Exclusión del hígado, Plasma, 5, 0.22 ± 0.05 , 0.0156 ± 0.0045 Conducto torácico, Linfa, 4, 14.98 ± 2.84 , 0.0124 ± 0.0039 Perifusión intestinal in situ, Buffer, 4, 0.027 ± 0.00003 , 0.0082 ± 0.0018 . El fenómeno no se observa post castración y no reaparece por estrogenización de la rata. El tramo final de la gestación de la rata es una circunstancia en la que el fenómeno tendría vigencia fisiológica. A partir del cuarto día anterior al parto, en paralelo con las concentraciones de GH endógeno (Jahn, Rastrilla y Deis; 1993), los TAG aumentan exponencialmente en el plasma (hasta 0.8 g.L⁻¹(-1)). Este aumento es independiente de la cantidad de alimento ingerido previamente. La administración de rhGH produce aumento (paradojal) de la síntesis/absorción de TAG por el intestino. El mecanismo afectado por la hormona es de gran capacidad ya que la tasa de aumento de TAG en plasma no se modifica con concentraciones iniciales de TAG entre de 0.12 a 14.98 g.L⁻¹(-1).

601. (7871) ALTERACIONES EN LA POBLACIÓN SOMATOTROPA ADENOHIPOFISARIA LUEGO DE INMUNONEUTRALIZACIÓN DE LA TIMULINA SÉRICA DURANTE LA VIDA TEMPRANA DE RATONES.

CAMIHORT, GISELA¹; LUNA, GEORGINA¹²; FERESE, CELIA²; BRACAMONTE, MARIA¹; GOYA, RODOLFO³; CONSOLE, GLORIA¹²

Cátedra 'B' de Histología-Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP¹, CICBA², INIBIOLP³

El sistema inmune está funcionalmente unido al sistema neuroendocrino, sugiriéndose la existencia de un eje timo-pituitario. La inmunoneutralización de la timulina sérica durante la vida temprana pretende explorar dicho eje. Se investigaron los cambios inmunohistoquímicos morfométricos en la población somatropa. Ratonas hembras y machos C57BL/6 fueron inyectados con suero normal de conejo (SNC) o con antisuero anti-timulina (AAT)(12µl/g, vía i.p.) en los días 2, 3, 7, 14, 21 y 29 de vida postnatal. A los 33 días fueron sacrificados, obteniéndose las pituitarias que fueron procesadas para microscopía de luz y muestras séricas para la determinación de timulina mediante RIA, 10 días: pre-tratamiento 288±81; post-tratamiento 24±20 fg/ml y bioensayo de rosetas. Se inmunomarcó con un sistema antiGH-EnVision-DAB. Se registraron los parámetros morfológicos mediante videomicroscopía: densidad de volumen (DV), densidad de células (DC) y tamaño celular (TC). Se hallaron cambios significativos en hembras y machos tratados (AAT) respecto a controles (SNC), en DC(p=0.01) y TC(p=0.0005).

	Hembras	Hembras	Machos	Machos
GH	SNC	AAT	SNC	AAT
DV (x10 ⁻²)	30.4 ± 5.8	31.9 ± 4	35.8 ± 4	36.4 ± 2
DC (x10 ⁻⁴)	56.2 ± 12	52.6 ± 1*	50.7 ± 2	46.3 ± 4*
TC (µm ²)	55.1 ± 2	59.1 ± 6*	72 ± 10	81.6 ± 6*

La población somatotropa en machos y hembras, mostró una hipoplasia con hipertrofia celular compensadora, que sugieren una comunicación timo-pituitaria. El control neuroendocrino del timo parece ser complejo, con la posible influencia de un circuito biológico en el que las hormonas pituitarias regularían los receptores de las células epiteliales tímicas.

ENDOCRINOLOGÍA 4

602. (6631) CORRELACIÓN ENTRE FIBRINOGENEMIA Y VISCOSIDADES SANGUÍNEA Y PLASMÁTICA EN DIABÉTICOS. D'ARRIGO, MABEL; CARRERA, LARISA; FORESTO, PATRICIA; ETCHEPARE, RAÚL; D'OTTAVIO, ALBERTO; VALVERDE, JUANA

Lab. Inmunoem. y Hemorreol. Fac. Cs. Bioq. y Farm. Cát. Histología Fac. Cs. Méd. UNR.

La Diabetes Mellitus desarrolla durante su evolución una microangiopatía que deteriora diversos territorios orgánicos como la piel en la que pueden encontrarse eritema simil erisipela, púrpura pigmentaria, telangiectasias periungueales, dermatopatía diabética o rubeosis facial. En el compromiso microcirculatorio intervendrían determinados parámetros hemorreológicos como la viscosidad sanguínea(Vse), la viscosidad plasmática(Vp) y la fibrinogenemia(Fp). El objetivo del presente estudio fue evaluar el grado de correlación entre el aumento del Fp y el aumento de las Vp y de Vse en un grupo de pacientes diabéticos (PcDBT) con lesiones cutáneas microangiopáticas. Se evaluaron 36 PcDBT, de los cuales 11 presentaron las referidas lesiones y 19 controles no diabéticos. En ellos se determinó Fp, Vp a 1.15 seg⁻¹ y Vse a 4.60 seg⁻¹ y se aplicaron los coef. de correlación de Spearman y Pearson a los valores encontrados. Las correlaciones entre Fp y Vp a 1.15 seg.⁻¹ y Vse a 4.60 seg.⁻¹ resultaron elevadas r (coef. Pearson) > 0.897 y rs (coef. Spearman) > 0.812 y significativas (p < 0.01). Se propuso un gráfico de dispersión donde se ajustó una recta capaz de actuar de predictora entre los valores de una variable y otra. La ecuación de la recta de ajuste para F versus Vse 4.60 seg⁻¹ fue 137.02 + 17.17 con R²=0.804 y para F versus Vp 1.15 seg⁻¹ fue 74.90 + 16.75 con

R² = 0.838. El modelo propuesto explica el 80% y el 84% de la variación del F por variación de Vse y Vp respectivamente. Por su parte, por cada unidad de aumento de Vse o de Vp, el fibrinógeno aumenta en 137 y en 75 unidades respectivamente. Los resultados encontrados permiten inferir que el aumento del fibrinógeno constituye un factor de suma relevancia en el deterioro microcirculatorio que sufren estos pacientes ya que su sólo aumento determina cambios importantes en las viscosidades sanguínea y plasmática de estos pacientes contribuyendo, de esta manera, a la posible aparición de lesiones cutáneas microangiopáticas.

603. (6896) ESTUDIO LONGITUDINAL DEL PLEXO DE AUERBACH EN INTESTINO DE UNA LINEA DE RATA OBESA Y DIABÉTICA TARDÍA. HISANO, NORIYUKI

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

En Reuniones anteriores habíamos presentado las imágenes del plexo de Auerbach en ratas β (obesas, hipertriglicéridémicas, diabéticas tardías) a los 4 y 8 meses de edad presentaban una imagen de destrucción plexual. En la presente comunicación informamos sobre las modificaciones de las imágenes del plexo de Auerbach intestinal desde los 2 meses hasta los 18 meses de edad. Ratas machos de la línea β de 2, 4, 8, 12, y 18 meses de edad, alimentadas con una composición balanceada comercial (Cargill) y agua ad libitum fueron sacrificados por sobredosis de éter. Mediante laparotomía mediana fueron disecados el intestino delgado y colon, liberados de grasa, lavados su contenido con PBS, medidos y pesados. Segmentos del intestino delgado, del colon proximal y distal fueron procesados mediante la técnica histoquímica del NADH El peso corporal, así como el peso y longitud del intestino delgado y del colon aumentan con la edad. Las estructuras reticulares del plexo del Auerbach están presentes en los animales de 2 meses de edad, pero ya se observan algunas zonas vacías dentro de los ganglios ("fantasmas neuronales"), fragmentación parcial de la estructura reticular, aumento de la vascularización o cambios en el fondo muscular. Estas regiones afectadas se entremezclan con zonas totalmente normales. A medida que los animales van madurando se observa zonas de destrucción de la estructura plexual van avanzando sobre las estructuras normales, pudiéndose considerar que las imágenes más severas consisten en: destrucción de la imagen reticular, neuronas aisladas, fondo muscular en forma de grumos NADH positivos, aumento de vascularización con paredes musculares NADH positivos. Disminución de la cantidad neuronal en zonas de imágenes reticulares conservadas. Las modificaciones son más acentuadas en el intestino delgado que en el colon. Las modificaciones de la estructura del plexo de Auerbach observadas en esta línea de ratas, que no coinciden con los animales controles, estarían vinculados a su dismetabolismo por influencia genética

604. (6897) HISTOLOGIA DEL PLEXO DE AUERBACH EN EL INTESTINO DELGADO Y CIEGO DE RATAS INYECTADAS CON ALOXANO EN EL POSDESTETE. RODRÍGUEZ, GUILLERMO; HISANO, NORIYUKI

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

La diabetes puede acompañarse de disfunción intestinal. A tal efecto se han estudiado la estructura del plexo de Auerbach en los distintos segmentos del tubo digestivo. 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 del intestino delgado y ciego. A ratas machos de 25.56 ± 0.56 días de edad de la línea "m" se les inyectó aloxano (A)(24 mg/100g peso corporal), se determinó la glicemia; a los controles (C) se les inyectó agua destilada (10cc/100g peso corporal). 4-5 animales para cada grupo etario. Se sacrificaron por sobredosis de éter a los 31, 46, 62 y 75 días de edad. Se disecaron los intestinos delgados y ciegos, lavados con PBS, medi-

dos y pesados. Segmentos del intestino delgado y del ciego fueron procesados para la técnica histoquímica del NADH. Los resultados cuantitativos se expresan en promedio \pm error standard de la media. Se presenta un menor peso total en las ratas A desde los 31 días (ej.: peso rata (g) 31 días: C 102.50 \pm 2.33, A 52.08 \pm 5.77)(P<0.05). En cuanto a ciego se observa macroscópicamente en las ratas A mega ciego a los 45, 62 días que disminuye a los 75 días de edad; sin embargo, el peso cecal es mayor en ratas A a los 62 días (peso ciego (g) C 1.78 \pm 0.36, A 2.33 \pm 0.24) y 75 días (peso ciego (g) C 1.46 \pm 0.04, A 2.39 \pm 0.36)(P<0.05). De la misma forma, en intestino delgado existe mayor peso en ratas A a los 62 días (peso int. delg. C 10.90 \pm 0.71, A 13.20 \pm 0.59) (P<0.05), los 75 días (int. delg. C 12.71 \pm 0.67, A 15.31 \pm 0.65)(P<0.05). Histológicamente, en intestino delgado de ratas A se observa tempranamente una destrucción parcial de la estructura reticular del plexo de Auerbach que aumenta con la edad. En cuanto al ciego, en ratas A presenta zonas sin plexos, y en otras zonas, retículos incompletos, que presentan disminución neuronal. No se descarta la posibilidad de que las modificaciones observadas en el plexo de Auerbach se deban a un efecto tóxico del aloxano.

605. (7064) INDUCCION DE LA EXPRESION TESTICULAR DE TGF-BETA1 Y ORNITINA DECARBOXILASA POR SEROTONINA. DEGESE, MARIA SOL; FRUNGIERI, MONICA; ALBRECHT, MARTIN; MAYERHOFER, ARTUR; CALANDRA, RICARDO; GONZALEZ CALVAR, SILVIA

IBYME; LMU, Munich, IMBICE, UNLP,UBA

Previamente describimos la acción de serotonina (5-HT) como modulador local de la esteroidogénesis testicular en el hámster. Recientemente, se describió una acción proliferativa de 5-HT en ciertos tipos celulares. En este trabajo se analizó el rol de 5-HT en los mecanismos involucrados en la homeostasis celular testicular. A partir de hámsteres adultos mantenidos en fotoperíodo normal (FN:14 h luz:10 h osc.) y de animales adultos expuestos durante 16 semanas a fotoinhibición (FI:6 h luz:18 h osc.) se purificaron células de Leydig, las que fueron incubadas en presencia o ausencia de 5-HT (1 μ M) en condiciones basales (Control) y estimuladas con hCG (100mUI/ml) (20 min) y se determinó por RT-PCR la expresión de TGF-beta1 y ornitina decarboxilasa (ODC), factores involucrados en la proliferación y diferenciación celulares. Los resultados obtenidos muestran que 5-HT induce la expresión de TGF beta1 y ODC en condiciones basales y estimuladas con hCG tanto en animales en FN como en FI. Comparativamente, se estudió si este efecto también se observaba en una especie no fotosensible como el ratón, utilizando la línea celular TM3. Las células, crecidas en medio Dulbecco con suero, se sincronizaron durante 24 hs. El tratamiento con 5-HT (1 μ M) (20 min.) no modificó la expresión de TGF-beta1 ni ODC en las células TM3. Además, se analizó si 5-HT (1 μ M) durante 24 h, podría inducir la proliferación. Este efecto fue evaluado con un kit comercial, determinando la absorbancia (490 nm) del formazan producido. No se observó efecto proliferativo de 5-HT en las células TM3 (Control: 0.372 \pm 0.021; 5-HT: 0.349 \pm 0.017 unidades arbitrarias). En conclusión, los presentes resultados muestran que, en una especie fotosensible como el hámster, la 5-HT modifica la expresión de TGF-beta 1 y ODC, sugiriendo su participación en los mecanismos de desarrollo y proliferación celulares.

606. (7251) METABOLISMO DE POLIAMINAS EN EL EPIDÍDIMO DE HAMSTER. NEGRO, MARIA LAURA; DEGESE, MARIA SOL; HOCKL, PABLO; CATALANO, PAOLO; LIBERTUM, CARLOS; CALANDRA, RICARDO; GONZALEZ CALVAR, SILVIA

IBYME, IMBICE, UNLP, UBA

Las poliaminas (PA): putrescina (Pu), espermidina (Sd) y espermina (Sp) son compuestos ubicuos y ejercen un rol central en la proliferación y desarrollo celulares. Se encuentran en altas

concentraciones en el tracto reproductivo masculino, y sus niveles están regulados por una combinación de enzimas tales como ornitina decarboxilasa (ODC), poliaminamina oxidasa (PAO) y espermidina/esperminaN1-acetil transferasa (SSAT). El objetivo del presente estudio fue analizar los niveles de PA en cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimos de hámsteres Dorados adultos y el perfil de las enzimas involucradas. Los epidídimos se disecaron, se separaron en Ca, Cu y Co, y se incubaron a 37 °C en buffer fosfato para remover y aislar los espermatozoides (Ez). El tejido se trató con ácido perclórico (70%) y en el sobrenadante se sintetizaron los correspondientes derivados dansilados, los cuales fueron separados por HPLC y cuantificados por un detector UV. Los resultados obtenidos fueron (media \pm SEM; n=8; pmol/mg prot): Ca: Pu 2273 \pm 205; Sd 992 \pm 307; Sp 1424 \pm 207; Cu: Pu 2229 \pm 227; Sd 1202 \pm 114; Sp 2922 \pm 203; Co: Pu 1748 \pm 67, Sd 1100 \pm 237; Sp 1580 \pm 131. El análisis estadístico (test de Tuckey) mostró un aumento significativo (p<0.001) en los niveles de Sp en el Cu epididimario respecto de Ca y Co. Por otro lado, únicamente en Ez de Co se detectó Sp (3676 \pm 361). Se analizó la expresión de ODC y SSAT, utilizando técnicas de RT-PCR y se determinó la actividad enzimática de PAO en los distintos fragmentos epididimarios. En conclusión, los presentes resultados revelan una variación en los niveles de PA en los distintos segmentos epididimarios en hamsteres adultos normales, así como en las correspondientes fracciones de Ez, sugiriendo que estas poliaminas podrían participar en el proceso de maduración espermática durante el tránsito epididimario.

607. (7284) EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE HISTAMINA (HA) SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN CÉLULAS DE LEYDIG DE RATÓN KNOCK OUT DE HISTIDINA DECARBOXILASA (HDC). MONDILLO, CAROLINA(1); PAP, ERNA(2); FALUS, ANDRAS(2); PIGNATARO, OMAR(1)

(1) Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, IBYME-CONICET. (2)Dep. de Genética, Biología Celular e Inmunobiología, Universidad Semmelweis, Budapest, Hungría.

HDC es la única enzima productora de histamina en mamíferos. Trabajos previos en ratones macho KO de HDC demostraron que la deficiencia de HA endógena interfiere con el desarrollo gonadal normal y altera la actividad esteroidogénica en el testículo adulto. A fin de evaluar posibles efectos de la deficiencia de HA sobre la funcionalidad de las células de Leydig en ratones KO, se plantearon los siguientes objetivos: a) Estudiar la esteroidogénesis basal y la respuesta de las células a hCG, en comparación con células de Leydig de ratones de genotipo salvaje (WT). b) Investigar los niveles de expresión de enzimas esteroidogénicas y receptores de HA (H[1]R y H[2]R) en ambos modelos experimentales. Métodos: Las células de Leydig fueron purificadas a partir de intersticio testicular de ratones Balb c WT y KO de HDC, por medio de un gradiente de Percoll. Se midieron los niveles de testosterona (T) por el método de ELISA. Se estudió la expresión relativa del gen de la enzima P450 scc (CYP11A) y de los genes H[1]R y H[2]R por el método de Real-time PCR. Resultados: Las células de Leydig de ratones KO sintetizaron niveles significativamente menores de T, tanto en condiciones basales como en presencia de hCG (En ng T/10(6) céls: Basal WT: 5,61 \pm 0,42; Basal KO: 1,47 \pm 0,13; hCG WT: 12,78 \pm 1,20; hCG KO: 4,98 \pm 0,63). Se observó menor expresión relativa de CYP11A en células de Leydig de ratones KO vs WT. hCG produjo un aumento en la expresión relativa de los genes H[1]R y H[2]R en células de ratones WT. Se observó el efecto opuesto en células de KO. En ratones KO de HDC, el camino esteroidogénico que conduce a la síntesis de testosterona estaría presente en las células de Leydig. Las células tienen además, capacidad de respuesta a hCG. Sin embargo, la falta de HA parece tener un efecto marcado sobre los niveles de expresión de enzimas clave del camino, como P450 scc. Por otra parte, la ausencia de HA también afectaría la expresión de receptores H[1]R y H[2]R.

608. (7572) LA INSULINA PROMUEVE ACTIVACION DE OXIDO NITRICO SINTASA MITOCONDRIAL VIA AKT EN MUSCULO ESQUELETICO DE RATA. FINOCCHIETTO, PAOLA; BARREIRO, FERNANDO; PODEROSO, JUAN JOSÉ

Laboratorio del Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas

Cambios postraduccionales relativamente específicos como acilación en N-terminal y fosforilación en Ser 1412 contribuyen a la traslocación de óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) a mitocondrias de diferentes tejidos de rata (mtNOS). En las organelas, mtNOS sintetiza óxido nítrico (NO) dirigido vectorialmente a la matriz; de acuerdo con la concentración de NO en el estado estacionario, se modulan la velocidad de transferencia de electrones, el estado de reducción de los componentes de la cadena respiratoria, la producción de especies activas del oxígeno y la captación de O₂. Considerando que Ser1412 integra un dominio dependiente de Akt y los efectos de insulina en la activación de esta quinasa, el objetivo del presente trabajo es relacionar efectos de insulina y actividad de mtNOS en el músculo esquelético. Con ese propósito, ratas Wistar (~ 200-250gr) fueron inyectadas con 0.1 U/Kg peso de insulina glargina o C1Na 0.9% s.c. y se extrajeron los músculos sóleus, extensoris digitorum, etc, a las 3 y 48 hs; la hipoglucemia fue evitada a través de administración de sacarosa (5% en agua de bebida). Las mitocondrias fueron aisladas por centrifugación diferencial y la actividad de mtNOS se determinó con H3-L-Arg y su expresión y la de fosfo-Akt por western blot con anticuerpos monoclonales. Los resultados demostraron que insulina aumenta la actividad de mtNOS (C: 30.43pmoles/ min/ mg prot vs 48hs: 145.8 pmoles/ min/ mg prot) (p<0.05) a las 48 hs sin cambios en su expresión, a las 3 hs no hay cambios en la expresión ni en la actividad y que la expresión de fosfo-Akt aumentó en mitocondria (38.8%) y citosol (59.7%; ambos p<0.05) a las 3 hs. Se concluye que Akt consecutivo a activación de PI3K por insulina puede trasladar a mitocondria y aumentar la actividad de mtNOS probablemente por fosforilación en Ser 1412. Este efecto reduce la utilización de equivalentes de reducción y facilita la actividad de vías metabólicas biosintéticas como la glucógenosíntesis.

609. (7605) EFECTO IN VITRO DE LA MELATONINA SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN RATAS PANCREATECTOMIZADAS. REYES, MARÍA PATRICIA; REYES-TOSO, CF; LINARES, LM; RICCI, CR; ARÁN, M; PINTO, JE; RODRÍGUEZ, RR; CARDINALI, DP

Depto. de Fisiología, Fac. Medicina, UBA, Paraguay 2155, 7° piso, 1121, Bs. As. Argentina.

El propósito de este estudio fue evaluar el mejoramiento de la contractilidad vascular con la melatonina (Mel), ya descrita en ratas diabéticas con estreptozotocina, en las ratas pancreatectomizadas (otro modelo de diabetes) con intolerancia a los hidratos de carbono. Se efectuaron pancreatectomías subtotales (ppx) a ratas Wistar machos adultas (n=9) (150-180 gr BW) obteniéndose pruebas de tolerancia a la glucosa alteradas, con valores postprandiales >8.3 mmol/l y euglicémicos en ayunas. A los controles (n=10) se les realizó laparotomía mediana. Los estudios se hicieron a los 60 días de la ppx. Tras el sacrificio por decapitación, se extrajo la aorta torácica, se la seccionó en anillos de 3mm de longitud, y se los colocó en soportes de acero inoxidable. A continuación se incubaron en una solución de Krebs, a 37°C a 1 atmósfera con 5% CO₂ y 95% de O₂. El desarrollo de tensión se evaluó con transductores de fuerza isométrica. Se registraron las respuestas a la fenilefrina (Phe) y a la acetilcolina (Ach) en ratas con y sin ppx incubados en un baño con glucosa normal 10mM (GN) o alta 44mM (GA). La ppx disminuyó significativamente la relajación de los anillos aórticos inducida por la Ach siendo este efecto amplificado al ser los anillos preincubados en la solución con GA (p<0.01). No se observaron diferencias significativas en la respuesta a la Phe. La incubación con Mel (10-5M) no modificó la relajación inducida por

Ach en los anillos colocados en la solución con GN. Sin embargo, fue efectiva para prevenir la disminución de la relajación observada en el medio con GA (p<0.01). La contractilidad a la Phe no fue afectada por la Mel. La ppx disminuye la relajación de los anillos aórticos inducida por la Ach. Este efecto se amplió al preincubar los anillos en una solución con GA, siendo revertido por la Mel. Teniendo presente que en un medio con GA hay mayor producción de radicales libres, la acción de la Mel podría ser debida a sus propiedades antioxidantes.

610. (7634) DESARROLLO DE UN MÉTODO IN-VITRO PARA EVALUAR LA FUNCIONALIDAD Y VIABILIDAD DE LOS ISLOTES PANCREÁTICOS PRE-TRASPLANTE QUE PERMITIRÁ A FUTURO LA PREDICCIÓN CLÍNICA GARCÍA, M; MONTEAGUDO, E; CEBALLOS, C; VIEIRO, M; BARBICH, M; ARGIBAY, P

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

El trasplante de islotes pancreáticos en los pacientes con diabetes tipo I puede resultar en la independencia insulínica y en un excelente control metabólico cuando se combina la infusión de una masa de islotes adecuada con una inmunosupresión libre de corticoides. Hasta el momento no existen métodos para evaluar la funcionalidad de los islotes en el breve tiempo disponible pre trasplante, a pesar que el trasplante de islotes pancreáticos ha alcanzado niveles de éxito clínico aceptables. Objetivo. Desarrollar un método reproducible, rápido y eficiente para evaluar funcionalidad y viabilidad de islotes. Material y métodos. Islotes humanos obtenidos de páncreas cadavéricos por digestión enzimática, purificados de tejido acinar, se incubaron en RPMI c/ glutamina, a pH 7.4 agregando glucosa anhidra hasta concentraciones de 50, 100 y 500 mg/dL. La funcionalidad se evaluó por secreción de insulina y péptido-C (método RIA) a 1, 3, 5, y 8 minutos en islotes que llevaban 0,6, 12 hs de cultivo. Estudios Histológicos (H-E y test de tunnel) e Inmunohistoquímico (insulina y glucagón) se realizaron en las muestras antes y después del estímulo. Los resultados se compararon con 2 métodos actualmente utilizados en centros de referencia (Universidad de Alberta y Universidad de Miami). Resultados. En 12 experimentos consecutivos, se observó óptima funcionalidad a 6 y 24h de cultivo tanto para insulina como para péptido-C (900±180 UI/ml y 7.5±2.8 ng/ml; 630±210 UI/ml y 2.5±1.3 ng/ml, respectivamente). Este método nos permite observar los picos de secreción (doble pico) con los cuales podemos evaluar a diferentes niveles el proceso de síntesis y secreción de insulina. El tiempo requerido por nuestro método fue 30 minutos. El método mostró ser reproducible, equiparable y más rápido que los otros, pudiendo resultar de utilidad para evaluar la funcionalidad y viabilidad de islotes pancreáticos pre-trasplante.

611. (7888) INFLUENCIA DEL NERVIU OVÁRICO SUPERIOR(NOS) SOBRE LA DENSIDAD DE BETA-ADRENORRECEPTORES EN ÚTERO DE RATA. PELLARIN, CARLOS; SOSA, ZULEMA; DOMINGUEZ, SUSANA; RASTRILLA, ANA

Universidad Nacional de San Luis

Las fibras nerviosas uterinas degeneran con la progresión de la preñez y se regeneran luego del parto; también ocurren pronunciados cambios durante la pubertad. Sin embargo, aunque un gran número de factores asociados tales como mecánicos, hormonales y de crecimiento son alterados bajo esas condiciones, no ha sido totalmente esclarecido el mecanismo de iniciación de dichos cambios. El objetivo del presente estudio es determinar si el NOS interviene en la innervación uterina; si su sección modifica la densidad de beta-adrenorreceptores uterinos y si esta innervación es responsable en parte del remodelamiento estructural que ocurre durante el ciclo estral en dos etapas de profundos cambios histológicos como es Estro (E) y Diestro 2 (D2). Se utilizaron ratas Holtzman adultas, mantenidas en condiciones de 12 horas luz- oscuridad con agua y comida ad libitum.

Extendidos vaginales diarios fueron obtenidos para el estudio del ciclo en ratas controles (Sham) y NOS seccionado (NOSx, experimentales). Se realizaron estudios histológicos de control en ambos grupos (6 animales por grupo). La trompa uterina izquierda fue dividida en tres porciones para el estudio y se realizó un pool de oviductos. La determinación de receptores se realizó por la técnica del 1125 cianopindolol. Se aplicó test de Student con una significancia de $p < 0.05$. Los resultados se expresan en femtomg proteína \pm SEM. Los resultados muestran que en ratas NOSx, hay un incremento de receptores durante el E ($p < 0.001$) y una menor densidad en D2 ($p < 0.05$) con respecto al control en las tres porciones de la trompa uterina como en oviducto. A su vez en D2 en ratas controles y NOSx, la densidad de receptores es menor respecto al E ($p < 0.05$). En la innervación uterina el NOS participa de acuerdo a la etapa del ciclo. Existe un aumento de receptores con la disminución de la innervación en E. En D2 los receptores están bajos, lo que coincide con el aumento de la innervación preparando el endometrio para la nidación en caso de fertilización.

612. (7900) INHIBIDORES DE LA OXIDO NÍTRICO SINTETASA (ONS) EN OVARIO MODIFICAN EL EFECTO COLINÉRGICO GANGLIONAR SOBRE LA LIBERACIÓN DE NITRITOS OVÁRICOS EN RATAS PREPÚBERES. DELGADO, SILVIA; SOSA, ZULEMA; CASAIS, MARILINA; RASTRILLA, ANA

Universidad Nacional de San Luis

El óxido nítrico (ON) ejerce funciones asociadas a la reproducción. Su enzima de síntesis presenta dos isoformas, una constitutiva y otra inducible (iONS). En ratas, la iONS se localiza entre otros tejidos en ovarios inmaduros e induce la esteroidogénesis. Objetivo: estudiar en ratas prepúberes usando el sistema in vitro Ganglio Celíaco-Nervio Ovárico Superior-Ovario (GC-NOS-O), la liberación de nitritos (metabolito soluble del ON) en la celda ovárica, por estimulación colinérgica ganglionar en presencia de inhibidores de la ONS en O. Se usaron ratas prepúberes, de 30 días de edad. El sistema GC-NOS-O, se incubó en celdas separadas GC y O unidos por el NOS en baño metabólico a 37°C en Krebs Ringer pH, 7.4. Se extrajo líquido de la celda ovárica a los 15, 30, 60 y 120 minutos y se evaluó los nitritos cuando se adicionó a) Acetilcolina (ACh) 10-6 M en GC; b) Inhibidor no selectivo L-NAME 100 M en O; c) Inhibidor selectivo Aminoguanidina (AG) 400 y 800 M en O; d) ACh + L-NAME y e) ACh + AG en las dos concentraciones. Estadística: se aplicó test de Student y ANOVA con una significancia de $p < 0.05$. Resultados: valores controles: Nitritos (nmoles/mg ovario \pm SEM): 15 min: 17.37 \pm 1.55; 30: 15.75 \pm 1.69; 60: 14.72 \pm 1.41 y 120: 10.34 \pm 1.24. a) ACh en GC aumentó la liberación de nitritos ($p < 0.001$). b) L-NAME y AG en los dos casos, inhibieron la liberación de nitritos con o sin ACh en GC c) AG fue mas eficiente en la concentración menor ($p < 0.001$). d) El efecto de L-NAME no mostró diferencia con el grupo ACh + L-NAME, mientras que AG en las dos concentraciones mostró diferencias con el grupo ACh + AG ($p < 0.001$). Los resultados indican que el ON es de origen fundamentalmente ovárico con un pequeño aporte ganglionar. ACh ejerce probablemente su efecto estimulador sobre ON, al menos en parte, a través de la iONS.

613. (8042) HEMO OXIGENASA MODULA NEGATIVAMENTE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN CÉLULAS DE LEYDIG TUMORALES MA-10. GRION, NATALIA; RECHE, CECILIA; PATRIGNANI, ZORAIDA; BAYONA, JULIO; MONDILLO, CAROLINA; PIGNATARO, OMAR

Lab de Endocrinología Molecular y Transducción de señales. IBYME-CONICET.

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la inhibición de la actividad de la hemo oxigenasa (HO) en células de Leydig de rata por SnPPiX produce un aumento de la esteroidogénesis tanto basal como la estimulada con una dosis submáxima con hCG. La HO cataliza la degradación del hemo,

produciendo biliverdina, CO y Fe(2+). Un posible blanco de acción de la HO, sería la inhibición de la actividad de la citocromo P450 scc(P450 scc); enzima regulatoria y de la esteroidogénesis. Dicho proceso estaría dado por la unión del CO al citocromo o por depleción del grupo hemo del mismo, indispensable para su actividad. Objetivo: Estudiar el mecanismo de acción de la hemo oxigenasa en la modulación de la esteroidogénesis en la línea tumoral MA10. Resultados: Se midieron los niveles de progesterona (P4: ng P4/10(6)células) en condiciones basales y estimuladas con dibutiril-AMPc (DB: 0.1mM), 22-R-colesterol (22-R: 5µM) y pregnenolona (P5: 5µM) en presencia o ausencia de SnPPiX (Sn: 100µM) durante 4hs. La presencia de Sn produjo un aumento tanto del nivel basal de P4 como los estimulados con DB y 22-R (CT: 1.01 \pm 0.12 vs Sn: 4.46 \pm 1.02 $p < 0.01$, DB: 13.90 \pm 4.87 vs DB+Sn: 34.42 \pm 3.76, $p < 0.001$, 22-R: 241.12 \pm 9.02 vs 22R+Sn: 385.21 \pm 10.21 $p < 0.001$). Por otra parte, el tratamiento con Sn no tuvo efecto sobre los niveles de P4 estimulados con P5 (P5: 495.63 \pm 52.94 vs P5+Sn: 641.93 \pm 53.78). Conclusión: Los resultados sugieren que la HO inhibiría la actividad de la citocromo P450scc, probablemente por depleción del grupo hemo o por unión del CO al citocromo, modulando de este modo los niveles de esteroides.

FARMACOLOGÍA 5: TOXICOLOGÍA 2

614. (6829) CONSUMO REPETITIVO DE ALCOHOL, SU BIOACTIVACIÓN A ACETALDEHÍDO Y RADICALES LIBRES EN TEJIDO MAMARIO Y PROMOCIÓN DE CÁNCER DE MAMA IN SITU. MACIEL, MARÍA E.; RODRÍGUEZ DE CASTRO, CARMEN; FANELLI, SILVIA L.; DÍAZ GÓMEZ, MARÍA I.; CIGNOLI DE FERREYRA, ELIDA V.; CASTRO, GERARDO D.; CASTRO, JOSÉ A.

CEITOX (CITEFA-CONICET)

Existe evidencia epidemiológica humana y experimental de que el alcohol (EtOH) actúa promoviendo cáncer mamario. En estudios recientes demostramos que la xantina oxidoreductasa (XOR) citosólica mamaria biotransforma al EtOH en acetaldehído (AC) y radicales libres hidroxilo y que su fracción microsomal puede generar AC en presencia de NADPH y oxígeno. Ahora informamos que la administración de EtOH por 28 días (dieta Lieber & De Carli): 1) indujo 80% la vía XOR (control: 33.9 \pm 0.3; EtOH: 60.9 \pm 1.8 ng AC/mg prot); 2) indujo 27% la vía microsomal (control: 66.5 \pm 1.4; EtOH: 84.5 \pm 0.3 ng AC/mg prot); 3) disminuyó significativamente el contenido de grupos sulfidrílo proteicos (control: 90.48 \pm 4.30; EtOH: 63.29 \pm 6.81 nmol SH/mg prot) pero no aumenta los carbonilos proteicos significativamente (control: 5.44 \pm 0.45; EtOH: 4.62 \pm 0.27 nmol CO/mg prot). La actividad de la XOR evidenciada histoquímicamente está localizada en las células epiteliales mamarias. Se observaron por microscopía electrónica alteraciones significativas en estas células por efecto del alcohol. Ellas fueron: los núcleos mostraron formas marcadamente irregulares, frecuentemente con invaginaciones de la envoltura nuclear y condensación de la cromatina. Se observó dilatación de los poros nucleares con material filamentosos saliendo hacia el citoplasma. Las células epiteliales de mama son capaces de generar in situ el mutágeno/carcinógeno acetaldehído y de promover la formación de radicales libres capaces de producir estrés oxidativo, daño celular y promover cáncer. Financiado por subsidios PICT 5-6045/99 (ANPCyT) y PIDA UF015 (UNSAM).

615. (6830) DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD NITRORREDUCTIVA DEL NIFURTIMOX Y EL BENZNIDAZOL EN EL TEJIDO MAMARIO DE RATA. ANALISIS DEL RIESGO TOXICOLOGICO POTENCIAL. BARTEL, L C; MONTALTO DE MECCA, M; CASTRO, J A

CEITOX (CITEFA-CONICET) J B de La Salle 4397, Villa Martelli, Bs As E-mail: ceitox@dd.com.ar

El Nifurtimox (Nfx) y el Benznidazol (Bz), dos fármacos empleados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, han evi-

denciado en su uso clínico y en estudios experimentales efectos laterales tóxicos. La toxicidad está vinculada con la formación de metabolitos reactivos generados durante su nitrorreducción, mediada por enzimas como P-450 reductasa, citocromo P-450, xantino oxidorreductasa (XOR) o aldehído oxidasa. El objetivo del presente trabajo es verificar si ambos compuestos están presentes en el tejido mamario de ratas hembra Sprague Dawley tratadas; si allí se nitrorreducen y si de ello resulta daño alguno. La concentración de estos fármacos se determinó por HPLC. El contenido mamario a 1, 3 y 6 horas después de la administración intragástrica fue: 18.5 ± 7.0 , 17.4 ± 1.7 y 6.1 ± 2.7 nmol Nfx/g de tejido y 47.7 ± 10.7 , 73.8 ± 16.6 y 55.1 ± 15.5 nmol Bz/g de tejido. Sólo el Nfx se nitrorredujo en el tejido mamario. En microsomas la actividad fue 378.5 ± 88.0 pmol de Nfx/mg prot x min, parcialmente inhibida por CO y por difenileneiodonio (DPI). En citosol la actividad fue 190.9 ± 17.2 pmol Nfx/mg prot x min, purina dependiente e inhibida por alopurinol. In vitro, no se observó formación de nitritos por reacción directa del Nfx con compuestos sulfhidrúlicos. Sin embargo, in vivo se detectó disminución del contenido de sulfhidrúlicos ($p < 0.01$) y no de carbonilos proteicos. En el tejido mamario de rata ocurren nitrorreducciones bioactivantes del Nfx y no del Bz. La presencia de Nfx conduce a cambios significativos en el contenido de grupos sulfhidrúlicos proteicos. La nitrorreducción de Nfx y la formación de especies reactivas de oxígeno que implica, podría explicar la capacidad del mismo de generar tumores mamaros informada por otros autores. Apoyado por FONCyT, PICT/00-5-9941

616. (7600) EFECTO DE LA GENISTEINA SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATAS ADULTAS EXPUESTAS AL VANADIO. QUIROGA, ARIEL; BIANCARDI, M.EUGENIA; ALVAREZ, SANDRA; SOAZO, MARINA; GARCIA, GRACIELA

Area Morfología. Facultad De Ciencias Bioquímicas Y Farmaceuticas. UNR. Suipacha 570. Rosario

La genisteína (G) es un isoflavonoide presente en la soja y sus derivados, entre otros alimentos de origen vegetal. Estudios «in vitro» han demostrado un efecto bloqueante de la genisteína sobre la acumulación de especies reactivas al oxígeno y la apoptosis en neuronas de hipocampo. Sin embargo hay investigadores que no adjudican a la G un efecto protector sobre el cáncer y enfermedades cardiovasculares en forma concluyente. Es más, a altas dosis los efectos adversos podrían superar a los beneficiosos ya que serían mutagénicos, pro-oxidantes e inhibidores de enzimas claves para el metabolismo hormonal. Nuestro objetivo fue analizar el efecto antioxidante de la G sobre el SNC de ratas adultas, a través de estudios comportamentales e histológicos. Se utilizaron ratas Wistar macho de 60 días de edad que fueron alimentadas durante 30 días con alimento especialmente formulado. Los grupos control (C) y vanadio (V) recibieron alimento con caseína, el grupo V+G recibió alimento con 500 ppm de G. Los grupos V y V+G recibieron una dosis de metavanadato de sodio (3mgV/kg p.c., i.p.; tratamiento oxidante) 5 días antes de finalizar el tratamiento. No se observaron mejorías significativas en las pruebas comportamentales de campo abierto ni en el test del rolo en las ratas del grupo V+G respecto del grupo V. En los estudios histológicos se observó una tinción significativamente mayor para NADPH diaforasa en las neuronas de hipocampo, cerebelo y núcleo paraventricular en los animales tratados con V+G respecto del grupo V. Se observó también astrogliosis y expresión de HSP-70 en el cerebelo del grupo V+G. Estos resultados sugieren que la genisteína en la dosis utilizada, presentaría un efecto pro-oxidante sobre el SNC de ratas adultas.

617. (7717) EFECTO DEL ACIDO 2,4 DICLORO-FENOXIACETICO (2,4-D) SOBRE PROTEINAS RESPONSABLES DE LA COMPACTACION DE LA MIELINA. KONJUH, CINTIA; LÓPEZ, MARGARITA (2); BRUSCO, ALICIA (2); E. DE DUFFARD, ANA MARIA; DUFFARD, RICARDO

LATOEX. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR, (2) Instituto de Biología Celular y Neurociencia. LANAIS-MIE. Facultad de Medicina.UBA

El SNC es un órgano "blanco" en la exposición al ácido 2,4-D (fenoxiherbicida utilizado para eliminación de malezas de hoja ancha). El objetivo de este trabajo fue determinar el grado de correlación entre la expresión de proteínas específicas de mielina, la proteína básica de mielina (BMP) y la CNPasa, y el grado de compactación de la mielina estudiado previamente por microscopía electrónica. Con el fin de descartar el compromiso de la desnutrición sobre estos efectos, se consideraron cinco grupos experimentales: BN (bien nutridos, camadas de 8 crías por madre); HN (hiponutridos, camadas de 14 crías por madre); BN70 (BN cuyas madres recibieron 2,4D 70 mg/kg/día desde el día 9 hasta el 21 postnatal); BN100 (idem anterior pero dosis de 100mg/kg/día); HN70 (HN cuyas madres recibieron 2,4D 70 mg/kg/día desde el día 9 hasta el 21 postnatal). Por "immunoblotting" la CNPasa demostró estar en aproximadamente la misma cantidad en BN, BN70 e HN pero la expresión disminuyó considerablemente en HN70 y BN 100 en donde no es registrable. En cuanto a la MBP su expresión disminuyó con las dosis de 2,4D y también con la hiponutrición de tal manera que resultaron no detectables en BN100 e HN70. Estos resultados se correlacionan con los resultados ultraestructurales: el interperíodo de 9nm (BN, HN y BN70) llega a 11 nm (BN100) y a 12 nm (HN70); la línea densa de 3nm (BN) y 2.4nm (HN) pasa a 2.4 nm (BN70), 1.78 nm (HN70) y 2.3nm (BN100). Estos resultados confirmarían que ambas proteínas son fundamentales para la estabilización y compactación intra y extracelular de las membranas que forman la mielina, que ese grado de compactación y regularidad es dependiente de las concentraciones proteicas que se ven alteradas por el tratamiento con este fenoxiherbicida.

618. (7739) ALTERACIONES COMPORTAMENTALES PROVOCADAS POR EL HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) EN RATAS. CHOLICH, V.; DUFFARD, R.; EVANGELISTA, AM

Laboratorio de Toxicología Experimental (LATOEX). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.

El 2,4-D es un herbicida ampliamente utilizado. Diversos estudios indican que alteraciones de los sistemas serotoninérgicos y dopaminérgicos mediarían algunos de los cambios comportamentales observados en ratas. En este trabajo los animales fueron tratados a partir del día 16 de gestación por vía oral con 70 mg 2,4-D/kg/día de acuerdo a trabajos previos en el LATOEX. Los animales controles recibieron la misma alimentación pero sin el herbicida. Luego del destete, las crías fueron asignadas a uno de dos subgrupos: T1 (alimentadas con dieta no tratada hasta el sacrificio) o T2 (alimentadas con dieta tratada durante toda la vida). Se evaluaron los siguientes estudios comportamentales: Prueba de olor preferencial (Lacerra y col, 1999): la finalidad de esta prueba fue orientar hacia una alteración en la capacidad olfativa en ratas machos. El olfato cumple una función primordial en la expresión del comportamiento sexual y una indiferencia sexual podría ser la resultante de una función disminuida o nula por acción de xenobióticos sobre las células olfativas. Prueba en un laberinto elevado en forma de T (Graeff y col, 1998): en esta prueba la evitación inhibitoria hacia los brazos abiertos -tarea condicionada- y el escape de los brazos abiertos -tarea incondicionada- han sido relacionadas al fenómeno de ansiedad y pánico, respectivamente. El objeto de este estudio fue orientar hacia una situación de ansiedad generada por el herbicida. Esto es probable debido a que en trabajos previos del LATOEX se demostró que 2,4-D alteró la prolactina y esta situación a su vez generó un estado de ansiedad. Se demostró que los machos expuestos crónicamente al 2,4-D no respondieron al estado olfativo de las hembras en proestro. Los resultados obtenidos en la prueba del laberinto en T revelaron diferencias significativas tanto en la tarea condicionada como no condicionada en-

tre los animales controles y tratados (T1 y T2). No observándose diferencias entre T1 y T2. De esto se concluye que 2,4-D se estaría comportando como un agente ansiogénico.

619. (7743) ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS PROVOCADAS POR LA ADMINISTRACIÓN A LARGO PLAZO DE COTININA EN RATAS. SASSONE, ADRIANA HAYDEE; LENZKEN, CAROLINA; MERINI, LUCIANO; FERNÁNDEZ, MARÍA; PÉREZ, MARÍA JULIA; LAGO, NÉSTOR; PERAZZO, JUAN CARLOS; ROSES, OTMARO; LÓPEZ, CLARA MAGDALENA

Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Introducción: La mayoría de los efectos provocados por el humo del cigarrillo se explican por la acción de la Nicotina (NI). Sin embargo poco se sabe de la acción en seres vivos de otras bases derivadas de la NI como la Cotinina (COT). Objetivos: Evaluar los efectos de NI y COT sobre diferentes órganos de rata después de 4 meses de tratamiento. Materiales y Métodos: 40 ratas Sprague Dawley adultos machos de 250 g de peso corporal fueron divididas en 5 grupos experimentales (n=8): I: NI 5 mg/kg/día; II: NI 10 mg/kg/día; III: COT 4 mg/kg/día; IV: COT 8mg/kg/día y V: control con agua de red. La administración se realizó en el agua de bebida durante 120 días. Todos los grupos fueron alimentados ad libitum con dieta comercial estándar y fueron mantenidos en un bioterio que cumplió con las normas OECD. Al final del tratamiento los animales fueron sacrificados y se realizó la histopatología para microscopía óptica, con coloraciones de rutina y microscopía de alta resolución de corazón, hígado, riñón y pulmón fijándose en formol buffer y en glutaraldehído al 3% en cacodilato de sodio 0,1M respectivamente. Resultados: En el grupo IV (COT 8mg/kg/día) se observaron lesiones capilares y pericapilares, infiltrados de tipo crónico en riñón y pulmón mientras que en el resto de los grupos no se observaron cambios histopatológicos. Conclusiones: Estos resultados sugieren la posible participación de la COT en las alteraciones vasculares crónicas del tabaquismo

620. (7833) LETHAL ACTIVITY NEUTRALIZATION BY SPECIFIC ANTIBODIES ANTI-PLA2 FROM CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS VENOM. RODRÍGUEZ, JUAN PABLO (1); ROMERO, ALEJANDRO (2); LEIVA, LAURA (1); ACOSTA, OFELIA (2)

FaCENA, UNNE. Av. Libertad 5400, (3400) Corrientes; (1) FaCENA, UNNE. (2) Fac. de Cs. Veterinarias, UNNE, Sgto Cabral 2'139, (3400) Corrientes

Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) venom possesses myotoxic and neurotoxic activities, both of which are also expressed by crotoxin, the principal toxin of this venom. Crotoxin, contains a basic phospholipase A2 (PLA2) and a non toxic acidic protein, crotapotin. In this work we have produced and investigated the ability of antibodies raised in rabbits against PLA2 to neutralize the lethality of the whole venom. PLA2 was isolated by gel filtration chromatography (Sephadex G-75). Intradermic via, intramuscular via, and antigen (PLA2) in the dilution used in routine inoculation (200 µg mL⁻¹) with adjuvant, were employed to produce the anti-sera. Groups of six mice (20 + 2 g.) were inoculated with 0,5 mL i.p. of C. d. terrificus venom (4µg mL⁻¹) or a mixture of venom that had been preincubated with the desired volume of rabbit anti-serum. The number of death recorded 48 hs after inoculation, showed 100% of anti-sera efficacy. It was concluded that the neutralization of *Crotalus durissus terrificus* venom by specific antibodies anti-lethal component could be useful to treat the envenomation by this snake. Thus, inconvenient of traditional immunotherapy would be bypassed with the development of a treatment using specific antibodies.

621. (7897) DAÑO VASCULAR EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL INDUCIDO POR VENENO DE PHILODRYAS

PATAGONIENSIS. PEICHOTO, MARÍA ELISA (1); RUIZ, RAQUEL (2); TEIBLER, PAMELA (2); MARUÑAK, SILVANA (2); GUAIMÁS MOYA, LUZ (2); LEIVA, LAURA (1); ACOSTA, OFELIA (2)

(1) FaCENA, UNNE. (2) Fac.de Cs Veterinarias, UNNE, Sgto Cabral 2'139 (3400) Corrientes

Philodryas patagoniensis es una culebra cuya secreción (de su glándula de Duvernoy) posee una toxicidad suficiente como para producir daños locales severos, tales como: edema, hemorragia, mionecrosis y dermonecrosis. Pacientes mordidos por esta culebra, a pesar de no haber presentado cuadro de intoxicación, más que un leve daño local, relataron tener fuertes dolores de cabeza, post accidente ofídico. Teniendo en cuenta que se trata de una secreción cuya potencia letal es similar a la de especies de *Bothrops*, fue de interés estudiar efectos sistémicos potenciales de esta secreción. Los estudios histológicos se llevaron a cabo en ratas, identificadas en grupos de cuatro, inyectadas i.v. de veneno en 0,3 ml de solución salina (dosis ensayadas: 0.95 y 1.80 mg/kg). El grupo control se inoculó con 0,3 ml de solución salina. A la hora de inoculación los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical. Se extrajeron muestras de hígado, riñón, corazón, pulmón, cerebro y cerebelo, las que fueron fijadas con solución Bouin y procesadas por técnica histopatológica y coloración con Hematoxilina Eosina. Las observaciones histológicas en muestras de tejidos de SNC obtenidas a la hora de inyección del veneno mostraron hemorragia perivascular y congestión tanto en cerebro como en cerebelo y meninges, en las tres dosis ensayadas, mientras que muestras control mostraron apariencia normal. Muestras provenientes de otros órganos, exhibieron congestión pero ausencia de hemorragia. Los resultados obtenidos demuestran que el veneno ó ciertos componentes del mismo, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y provocar hemorragias en SNC que pueden dejar secuelas en el individuo intoxicado.

622. (7981) DETERMINACION DE PARAMETROS DEL DESARROLLO Y REPRODUCTIVOS EN RATAS ADULTAS DE AMBOS SEXOS EXPUESTAS CRONICAMENTE AL ACIDO 2,4-DICLOROFENOACETICO (2,4-D). MADARIAGA, M; JAHN, G*; DUFFARD, R; EVANGELISTA, A

LATOEX-Fac. Cs. Bioq. y Farm.-Suipacha 531-UNRosario larlac-imbecu-cricyt (conicet)- Mendoza

Ratas vírgenes Wistar de 90 días fueron puestas a preñar y el grupo tratado se expuso al 2,4-D desde el día 16 de preñez (70 mg/kg/día de rociado en la comida). En el día postnatal 23 (DPN) las crías fueron destetadas, separadas por sexo, y el grupo tratado se siguió alimentando con comida tratada hasta el DPN90. Se estudiaron: curvas de crecimiento corporal, días de aparición de pelo (AP) y apertura ocular (AO). En las hembras: días de apertura vaginal (AV) y primer proestro (PP); ciclo estro (CE); niveles séricos de estradiol (E2) y progesterona (P); estudio histológico y recuento diferencial de folículos y cuerpos lúteos en ovario. En los machos: día de descenso testicular (DT); niveles séricos de testosterona (T); histología de testículos y epidídimos; medición del diámetro promedio (DP) y de la altura del epitelio (AE) de los túbulos seminíferos y recuento de espermatozoides (RE) del conducto deferente. Se observó una disminución en la ganancia de peso corporal de las crías del grupo tratado. Los días de AP, AO y DT no mostraron diferencias entre grupos. La AV ocurrió dentro del periodo esperado en todas las hembras, pero el día promedio del PP estuvo demorado y con una dispersión mayor para el grupo tratado que también mostró un mayor número de ratas con ciclos anormales. Los niveles séricos de P y la T no mostraron diferencias significativas mientras que el E2 aumentó significativamente (p<0,01) en el grupo tratado. Los estudios histológicos no revelaron alteraciones morfológicas en ningún órgano. El recuento diferencial de folículos mostró disminuciones significativas en el número de folículos primarios y secundarios (p<0,05) en el

grupo tratado. El DP y la AE de los túbulos seminíferos no mostraron diferencias, al igual que el RE. Estos resultados, junto con los obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, inducen a pensar en una toxicidad testicular indirecta y en una toxicidad ovárica directa del 2,4-D que no se manifestaría en la edad adulta.

623. (7991) EFECTOS NEUROENDOCRINOS INDUCIDOS POR EL ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) DURANTE LA LACTANCIA. STÜRTZ, NELSON

Laboratorio Toxicología Experimental (LATOEX). Fac. Cs. Biq. y Farmacéuticas. Univ. Nac. de Rosario

Una sustancia medioambiental que actúa como disruptor hormonal se define como un agente exógeno que puede interferir con la síntesis, secreción, transporte, unión a receptor, acción, o liberación de hormonas naturales en el organismo. Durante la lactancia la Prolactina (PRL) está involucrada en la síntesis de leche y la Oxitocina (Ox) con su eyección. La PRL es secretada desde la hipófisis anterior, y se encuentra bajo control inhibitorio hipotalámico mediado por Dopamina (DA) y estimulador mediado por serotonina (5-HT) junto con múltiples interacciones entre factores liberadores e inhibidores de origen hipotalámico y de la hipófisis posterior. Las células que producen Ox también producen Oxido Nítrico (ON) que inhibiría la secreción de Ox. El objetivo de este trabajo fue evaluar, en ratas madres en lactancia tratadas con 2,4-D su posible acción disruptora hormonal y caracterizar sus efectos sobre un período crítico del desarrollo como es la lactancia. Se sacrificaron las madres y sus crías en el día post parto 16. En estas se observaron disminuciones en la ganancia de peso corporal y aumento en el período de apertura de los ojos. El 2,4-D también produjo en la leche disminución del contenido de lípidos totales y variación en el perfil de ácidos grasos poliinsaturados. En las madres tratadas se observó disminución en el volumen de leche eyectada, indicando que los mecanismos involucrados en su producción y eyección son un blanco para la acción del 2,4-D. Además, se observó disminución en los niveles de PRL sérica. Las determinaciones del contenido tisular de DA presentó incrementos en el Nar y adenohipofisis mientras que la 5-HT mostró disminuciones en las mismas áreas. La disminución en la eyección de leche estuvo correlacionada con disminución en la concentración de Ox sérica. Se determinó inhibición de las enzimas sintetizadas del ON. También se realizaron mediciones del comportamiento materno en las madres tratadas con 2,4-D, observándose alteraciones en la latencia y duración del acarreo de las crías, así como aumento en la latencia de cefosis.

FARMACOLOGÍA 6: PRINCIPIOS NATURALES

624. (6728) EFECTO CARDIOPROTECTOR DE UN EXTRACTO DE ILEX PARAGUARIENSIS: EVIDENCIA DE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE ÓXIDO NÍTRICO. FANTINELLI, JULIANA (1); SCHINELLA, GUILLERMO (2); MOSCA, SUSANA (1)

(1) Centro de Investigaciones Cardiovasculares. (2) Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP

El objetivo de este estudio fue examinar los efectos de un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* (Ip) sobre las alteraciones sistólicas y diastólicas producidas por 20 min. de isquemia y 30 min. de reperfusión en el corazón aislado de rata. La función sistólica fue evaluada a través de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) y la +dP/dtmax. La función diastólica se evaluó a través de la -dP/dtmax y la presión diastólica final (PDF). Se calculó la resistencia coronaria (RC) como el cociente entre la presión de perfusión y el flujo coronario. El daño oxidativo del tejido se determinó midiendo la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El tratamiento con Ip (30 µg/ml) 10 min. antes de la isquemia y los primeros 10 min. de la reperfusión aumentó significativamente la recuperación postisquémica de la función miocárdica. Al final del

período de reperfusión los valores de los parámetros evaluados en los corazones tratados fueron: PDVI = $96 \pm 8\%$, +dP/dtmax = $95 \pm 10\%$, -dP/dtmax = $90 \pm 12\%$ y PDF = 20 ± 6 mmHg significativamente diferentes de los observados en corazones no tratados ($57 \pm 6\%$, $53 \pm 6\%$, $57 \pm 8\%$ y 43 ± 4 mmHg, respectivamente). El aumento de RC y de TBARS provocado por la isquemia-reperfusión fue atenuado por el tratamiento con Ip. La inhibición de la óxido nítrico sintetasa con L-NAME (L-[G]-nitro L-arginina metil éster) abolió el efecto protector de Ip sobre la función miocárdica y disminuyó los efectos beneficiosos sobre la RC y TBARS. Estos resultados demuestran que: 1) la administración de un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* atenúa las alteraciones miocárdicas provocadas por la isquemia-reperfusión y 2) esta acción cardioprotectora estaría mediada por un mecanismo dependiente de óxido nítrico.

625. 6730 EFECTO DE ARISTOLOCHIA ARGENTINA SOBRE MOTILIDAD Y SECRECIÓN DEL INTESTINO DELGADO. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA. WENDEL, GRACIELA(1); PEREIRA, SIRLEY(1); FUSCO, MARÍA(2); SOSA, ANGELA(2); PELZER, LILIAN(1)

(1)Farmacología. UNSL (2) Farmacognosia UNSL

Aristolochia argentina (A.a.) conocida como "charrúa", ha sido empleada en la medicina popular con propiedades astringentes, antidiarreicas, y antihemorroidales. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de A.a.(infusión 125mg/kg) en motilidad y secreción del intestino delgado, y evaluar la toxicidad aguda. Se utilizaron ratones Rockland y ratas Wistar. Se realizaron las siguientes determinaciones: Tránsito intestinal (Autore, 1993). Acumulación de fluido en intestino delgado producido por aceite de ricino (AR)(Di Carlo, 1994). Toxicidad aguda: los ratones fueron observados durante 7 días para registrar la mortalidad u otro síntoma tóxico. Se extrajo sangre para la determinación de enzimas hepáticas: GOT y GPT. Tránsito intestinal: en los controles, el marcador de carbono atravesó un $54.9 \pm 1.79\%$ de la longitud total del intestino delgado. A.a. redujo el tránsito intestinal ($41.5 \pm 1.8\%$; $p < 0.01$ vs. control). Fentolamina antagonizó significativamente el efecto inhibitorio de A.a. ($54.8 \pm 2.76\%$; $p < 0.001$ vs. A.a.), el cual no fue influenciado por atropina, verapamilo y propranolol. El volumen de fluido en intestino delgado tratado con AR fue de 28.78 ± 0.73 mg/cm, el pretratamiento con A.a. redujo esa acumulación (17.16 ± 1.92 mg/cm; $p < 0.001$ vs. AR). La evaluación realizada muestra que una simple dosis oral de la infusión en las concentraciones estudiadas (250 a 6000mg/kg) no produjo mortalidad ni síntomas visibles de toxicidad. No se observaron signos o síntomas de inquietud, depresión de la respiración, convulsiones o coma. No hubo diferencia significativa en los valores de GOT y GPT entre controles y tratados. Fentolamina antagonizó el efecto de A.a. en tránsito intestinal, sugiriendo la participación, al menos en parte del sistema alfa adrenérgico. La inhibición de la motilidad y la disminución de fluidos acumulados en intestino delgado, proveen una validación científica para el uso popular, como antidiarreico, de esta planta medicinal de nuestra región.

626. (6982) ACCION DE LOS FLAVONOIDES SOBRE EL EDEMA AGUDO MEDIADO POR HISTAMINA Y SEROTONINA. ROTELLI, ALEJANDRA; DE LA ROCHA, NADIR; PELZER, LILIAN

Cátedra de Farmacología. Universidad Nacional de San Luis

La inflamación aguda es una respuesta temprana de un tejido a la lesión y está mediada por sustancias como histamina, serotonina, cininas y eicosanoides entre otras. Los flavonoides son compuestos que se encuentran en las plantas y han demostrado poseer acción antiinflamatoria. Actualmente algunos laboratorios farmacéuticos los han incorporado entre sus especialidades medicinales para el tratamiento de trastornos vasculares. Objetivo: Evaluar a los flavonoides como posibles inhibidores de los mediadores histamina y/o serotonina en los procesos inflamatorios agudos. Material y Método: Se trabajó con ratas

Wistar, ambos sexos (120 a 150 g) y se utilizó el método de Singh y Pandey (1996) para el modelo de histamina y el de Kalbhen y Smalla (1977) para serotonina. Los lotes en estudio y controles fueron de 5 animales. Los compuestos se administraron a cada animal por vía intraperitoneal en dosis de 0,25 M/kg. Los lotes 1 y 7 recibieron Quercitina; los lotes 2 y 8 Rutina; los lotes 3 y 9 Hesperidina; los lotes 4 y 10 Hesperetina; y los lotes 5 y 11 Morina. Los lotes control 6 y 12 recibieron solución fisiológica por vía intraperitoneal. Una hora después se indujo el edema en la región subplantar de la pata izquierda con histamina al 1% en los lotes 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y con serotonina al 0,01% en los lotes 7, 8, 9, 10, 11 y 12. El edema de la pata fue medido mediante un pletismómetro a los 15, 30 y 60 min en el edema generado por histamina y a los 30, 60 y 120 min en el edema producido por serotonina. Resultados: El edema generado por histamina fue inhibido por hesperidina y quercitina sólo a los 15 min, mientras que todos los flavonoides mostraron acción inhibitoria altamente significativa $p < 0,01$ (entre un 31 y 57%) a los 30, 60 y 120 min en el edema producido por serotonina. Los flavonoides son eficaces antiinflamatorios en las primeras etapas de la inflamación aguda con una acción predominante sobre el mediador serotonina.

627. (7040) EL ÁCIDO CLOROGÉNICO NO MODIFICA LA ACTIVIDAD DE LA PGP INTESTINAL. NEIROTTI (1), SILVIA A; SCHAIQUEVICH (1), PAULA; NISELMAN (3), VIVIANA; RUBIO (1-2), MODESTO C

(1) Instituto Inv. Farmacológicas. (2) Cat. de Farmacología FFyB-UBA. (3) Cat. de Matemáticas FFyB-UBA

La Glicoproteína P (PGP), es una proteína de membrana que origina un flujo de una gran variedad de fármacos. La actividad de la PGP intestinal interviene en la biodisponibilidad oral de diferentes fármacos como quimioterápicos, antibióticos, drogas activas sobre el SNC, medicamentos cardiovasculares e inhibidores HIV. Además de funcionar como inhibidores o sustratos alternativos, numerosas drogas actúan como inductores de esta proteína. El objetivo de este trabajo es empezar el análisis de la influencia del extracto de yerba mate sobre la actividad de este transportador considerando el amplio uso en nuestra sociedad del mismo y la posible importancia que tendría en la variabilidad cinética que se observa en distintas drogas que son sustrato de este transportador. Se ha tomado como modelo para comenzar este estudio el intestino aislado y evertido de rata. El mismo fue validado con dos sustratos reconocidos del mismo (ranitidina 100 μ M y rodamina 123 5 μ M) y un inhibidor (verapamilo 100 μ M). Para ello los tejidos aislados fueron cargados con el sustrato respectivo y la cinética de flujo analizada durante 1 hora. Se comprobó el transporte lineal para ambos sustratos, medidos por HPLC y fluorimetría respectivamente, y el antagonismo del mismo por el inhibidor. El verapamilo 100 μ M inhibe en un 38 % el transporte de ranitidina ($p < 0.001$). El verapamilo 100 μ M también antagonizó el flujo de la rodamina 123 en un 66 % ($p < 0.001$). En relación con los principios activos de la yerba mate se comenzó analizando el efecto del ácido clorogénico que es uno de los componentes que se presenta en mayor concentración en el extracto. El mismo hasta una concentración de 100 μ M no modifica el flujo de la rodamina 123. Concluimos de este primer ensayo que el ácido clorogénico no presenta una actividad inhibitoria significativa sobre la actividad de la PGP y se continuará analizando el extracto total y demás componentes principales.

628. (7075) EFECTO DE CAPSAICINA SOBRE LA CITOPROTECCIÓN GÁSTRICA DE ARTEMISIA DOUGLASIANA EN RATA. MARÍA, ALEJANDRA (1); VILLEGAS GABUTTI, CARLOS (1); PERALTA, CECILIA (1); GIORDANO, OSCAR (2); PELZER, LILIAN (1)

(1) Farmacología UNSL (2) Química Orgánica UNSL

Introducción: Artemisia douglasiana Besser (A. d.) es empleada popularmente por sus propiedades antiulcerosas. El objetivo

del presente trabajo fue evaluar el mecanismo de la acción gastroprotectora de infusiones de A. d. y de dehidroleucodina (DhL) aislada de la misma, a través de la participación de neuronas sensibles a capsaicina en rata. Métodos: La acción gastroprotectora se evaluó por el método de Ishiyama (1989), que emplea dietilditiocarbamato y HCl 0.1 N como agentes ulcerogénicos, administrados luego de ligar el píloro de ratas Wistar. Los lotes experimentales recibieron 1 ml. de infusión de A. d. al 10% ó 1 ml. de DhL (40 mg/kg) 30 min. previos a la inducción de la úlcera. A las 5 h se evaluó el daño en mm(2). Para la ablación funcional de neuronas aferentes primarias se utilizó el método de Eliakim (1995). Se administraron ratas Wistar con capsaicina (20, 30 y 50 mg/kg, s.c.) durante tres días. A los 14 días se indujo el daño con etanol absoluto previa protección con DhL o la infusión. A los 60 min. de la administración del etanol se evaluó el estado de la mucosa gástrica con la escala de Marazzi, Uberti y Turba. Análisis estadístico: Test t de Student o ANOVA. Resultados: Método de Ishiyama: La infusión de A. d. y DhL previnieron las lesiones de la mucosa gástrica ($p < 0.05$ vs. control). Método de Eliakim: la infusión de A. d. y DhL protegieron la mucosa gástrica del daño inducido por etanol ($p < 0.001$ vs. control). El pretratamiento con capsaicina disminuyó la gastroprotección de DhL ($p < 0.01$), pero no la producida por la infusión. Conclusiones: Artemisia douglasiana y dehidroleucodina presentaron propiedades citoprotectoras en mucosa gástrica de ratas (método de Ishiyama.). Sólo en el mecanismo de acción gastroprotectora de DhL tendrían participación las neuronas sensibles a capsaicina (método de Eliakim).

629a. (7081) PARTICIPACIÓN DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA GASTROPROTECCIÓN MEDIADA POR BACCHARIS POLIFOLIA. MARÍA, ALEJANDRA (1); PERALTA, CECILIA (1); VILLEGAS GABUTTI, CARLOS (1); WENDEL, GRACIELA (1); GARCÍA, EDUARDO (2); NIETO, MATÍAS (2); PELZER, LILIAN (1)

(1) Farmacología UNSL (2) Química Orgánica UNSL

Introducción: Baccharis polifolia Griseb, conocida popularmente como "quincha mali", es empleada en la medicina popular para el tratamiento de patologías digestivas. El objetivo del presente estudio fue evaluar la participación de las prostaglandinas en el mecanismo de la actividad gastroprotectora de B. polifolia en rata. Métodos: La acción gastroprotectora se evaluó empleando diferentes modelos experimentales con los siguientes agentes ulcerogénicos: ácido clorhídrico 0.6N, hidróxido de sodio 0.2N y cloruro de sodio 25%. Se emplearon ratas Wistar administradas con el extracto etanólico de B. polifolia (dosis 1: 62.5 mg/kg, dosis 2: 125 mg/kg y dosis 3: 250 mg/kg), 1 h. previa a la inducción del daño. Se sacrificaron los animales 1 h. después del agente ulcerogénico, evaluándose el daño mediante la escala de Marazzi, Uberti y Turba. Para estudiar la participación de las prostaglandinas se utilizó un inhibidor de su síntesis, indometacina, previo a la administración del extracto etanólico de B. polifolia en úlceras inducidas por etanol absoluto (método de Robert, 1979). Análisis estadístico: ANOVA-Tukey Kramer. Resultados: Modelos de úlcera aguda: HCl 0.6 N: dosis 1: ns; 2: $p < 0.01$; 3: $p < 0.001$; NaOH 0.2N: dosis 1: ns; 2: $p < 0.05$; 3: $p < 0.01$; NaCl 25%: dosis 1: ns; 2: $p < 0.01$; 3: $p < 0.001$. Participación de las prostaglandinas: lote de protección (extracto + etanol) vs. control: $p < 0.001$; lote de protección vs. lote de protección con pretratamiento con indometacina: $p < 0.05$. Conclusiones: Baccharis polifolia presentó propiedades citoprotectoras en mucosa gástrica de ratas en los modelos de úlcera aguda por ácido clorhídrico 0.6N, hidróxido de sodio 0.2N, cloruro de sodio 25% (125 y 250 mg/kg). El pretratamiento con indometacina disminuyó la actividad citoprotectora gástrica de B. polifolia, por lo que se sugiere que las prostaglandinas participan en el mecanismo de actividad gastroprotectora.

629b. (7199) CARDIAC AND CENTRAL EFFECTS OF CECROPIA PACHYSTACHYA (AMBAY). CONSOLINI, ALICIA ELVIRA; RAGONE, MARIA INES; MIGLIORI, GRACIELA

Farmacología, Dpto Cs Biológicas, Fac. Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata

Cecropia pachystachya Mart. (Moraceae) is a plant known as "ambay" used in South America as antitussive. We have previously reported its hypotensive effect, higher for the plant from neotropical (Ntr) than for that from temperate (Tp) region. Now, we evaluated its cardiac in vivo and in vitro activity, and its effects on spontaneous behaviour. In vivo heart rate (HR) was studied from the blood pressure recording of anesthetized rats, cardiac inotropism (P, mmHg) was evaluated in isolated rat perfused hearts, and central effects were assessed by the open-field test (OF) in mice. Aqueous crude extracts were prepared, lyophilized, and administered by i.v on rats, i.p. on mice or diluted in perfusion. Ntr did not modify HR in vivo, while Tp at 180 mg/kg iv increased HR from 240 ± 19 to 308.2 ± 18 beats/min ($p < 0.05$). In reserpinized rats, Tp also increased HR by 40%. In isolated hearts, Tp increased P by $+26.6 \pm 5.8$ mmHg ($p < 0.05$) independently on concentration between 0.015 to 9 mg/100 ml. This effect was unaltered by 1 μ M propranolol, but significantly reduced by a 25 mM K-Krebs. In the OF test, Ntr reduced the number of squares explored to 48 and 39% of control at 320 and 600 mg/kg resp. ($p < 0.05$, $n=5$), decreased the rearing to 42, 36 and 24%, at 180, 320 and 600 mg/kg, resp., and impaired the grooming. Tp also reduced locomotor activity but only at 600 mg/kg to 39% of control, decreased the rearing to 36, 21 and 23% at 180, 320 and 600 mg/kg resp. ($p < 0.05$) and avoided grooming. Mice suffered ataxia with both, Ntr and Tp, but a 62% of them died after 24-36 h with 300-600 mg/kg of Tp. *Cecropia pachystachya* (ambay) has cardiotoxic activity evidenced by positive inotropism, which was avoided by activation of the Na,K-ATPase but not by β -adrenergic blockade. In vivo, the plant from the temperate region increased HR independently on NA-release and produced respiratory paralysis, suggesting cholinergic blockade. Both plants produced depression of exploratory and emotional activity, but the neotropical ambay was the less toxic. Grant from Col.Farm.PBA.

630. (7353) ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN EXTRACTO ACUOSO DE ILEX BRASILIENSIS. TOURNIER, HORACIO; SPEGAZZINI, ETILE (2); DEBENEDETTI, SILVIA (2); SCHINELLA, GUILLERMO

Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Médicas. - calles 60 y 120. (1900) La Plata. UNLP-CIC; Cátedra de Farmacognosia - LABRAM - Facultad de Ciencias Exactas. UNLP

Este trabajo compara la actividad antioxidante de la especie sudamericana *Ilex brasiliensis* (Ib) usada como bebida, suplemento dietario o en la medicina alternativa, con la conocida especie *Ilex paraguariensis* o yerba mate, (Ip), utilizando diferentes sistemas de generación de radicales libres. A partir de hojas secas y pulverizadas se prepararon extractos acuosos (infusión) y el material liofilizado se mantuvo a -20°C hasta su utilización. La capacidad de atrapamiento del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) se evaluó utilizando dos sistemas: a) hipoxantina/xantina oxidasa y b) leucocitos humanos estimulados con TPA. La inhibición del radical se detectó por la transformación del azul de nitrotetrazolio a 560 nm. En a) el comportamiento de Ib e Ip fue similar. ($\text{CI}[50]=16,2$ vs. $15,4$ $\mu\text{g/ml}$ respectivamente). En el ensayo b), 100 $\mu\text{g/ml}$ de Ib e Ip también inhibieron la producción celular de $\text{O}_2^{\cdot-}$. ($58,2$ y $70,1$ %) respectivamente. En otro ensayo se midió la capacidad captadora peroxinitrito (ONOO^-) obtenido a partir de NaNO_2 y H_2O_2 y utilizando Pirogalol Red como molécula detectora. En este ensayo Ib mostró una gran actividad comparada con Ip ($\text{CI}[50]=28,5 \pm 9,2$ vs. $170,7 \pm 24,1$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,01$). También se evaluó la capacidad de Ib e Ip para inhibir la oxidación de LDL de plasma humano inducida por Cu^{2+} . La oxidación se evaluó por la formación de dienos conjugados y de TBARS y el cambio en la movilidad electroforética de las LDL en gel de agarosa. Ambos extractos inhibieron con similar potencia la peroxidación lipídica y el aumento de la movilidad electroforética de LDL en el rango de 1-10 $\mu\text{g/ml}$. En los tres sis-

temas empleados las dos especies de *Ilex* mostraron importante actividad antioxidante. La potencia relativa mucho mayor de *I. brasiliensis* en el atrapamiento de peroxinitrito podría ser atribuida a su mayor contenido de fenoles totales y ácido ascórbico previamente demostrada.

631. (7378) ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE E INHIBIDORA DE XANTINA OXIDASA DE DOS ESPECIES DE GALLIARDIA. AQUILA, SILVIA VALERIA; ROSELLA, MARÍA; TOURNIER, HORACIO (2); SPEGAZZINI, ETILE; DEBENEDETTI, SILVIA; SCHINELLA, GUILLERMO (2)

Cátedra de Farmacognosia - LABRAM - Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. Cátedra de Farmacología - Facultad de Ciencias Médicas. 60 y 120. (1900) La Plata. UNLP - CIC.

El interés por el potencial terapéutico de las plantas medicinales capaces de reducir del daño tisular inducido por radicales libres es creciente. El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad antioxidante total (AOT) y el efecto sobre la xantina oxidasa (XO) de dos especies sudamericanas; *Galliardia megapotamica* utilizada en la medicina tradicional de Argentina, Uruguay y Brasil y *Galliardia cabreriae* que crece exclusivamente en nuestro país sin antecedentes de uso popular. Las partes aéreas en flor de ambas especies fueron recolectadas en Lihuel Calel (La Pampa, Argentina). El material seco y molido fue extraído sucesivamente con eter de petróleo (EP), diclorometano (DCM) y metanol (M). La actividad de XO se midió espectrofotométricamente siguiendo la formación de ácido úrico a partir de xantina, a 295 nm. La AOT de los extractos se determinó midiendo la actividad atrapadora de los radicales ABTS y DPPH y la capacidad reductora del complejo TPTZ- $\text{Fe}(3+)$ (FRAP). El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin Ciocalteu. DCM y M de ambas especies inhibieron la actividad de XO, a 100 $\mu\text{g/ml}$, *G. cabreriae* mostró mayor actividad (51,2 y 44,5 vs. 21,8 y 36,9% respectivamente, $p < 0,05$). DCM y M de ambas especies poseen AOT. DCM y M de *G. megapotamica* mostraron la mayor potencia atrapadora de radical ABTS ($\text{CI} 50=23,7$ y $13,9$ $\mu\text{g/ml}$ respectivamente) significativamente diferentes a las obtenidas para *G. cabreriae*. La AOT de los extractos se correlacionó positivamente con su contenido de fenoles totales. Utilizando radical DPPH y FRAP no se observaron diferencias significativas entre ambas especies. Las actividades antioxidante e inhibidora de XO observada en las especies estudiadas sugiere que sus extractos serían una fuente de compuestos de interés para proteger del daño oxidativo de sistemas biológicos producido por las especies reactivas del oxígeno.

632. (7427) COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE TRES FORMULACIONES QUE CONTIENEN EXTRACTO DE ALCACHOFA. ALONSO, MARÍA ROSARIO; SPAGNUOLO, ANDREA; FERRARO, GRACIELA; RUBIO, MODESTO

IQUIMEFA (UBA-CONICET), ININFA (CONICET)

En los últimos años se está observando un notable aumento en la elaboración y producción de fármacos con actividad colagoga y colerética, que contienen extractos de alcachofa (*Cynara scolymus*). Los test "in vitro" permiten evaluar la velocidad de liberación del principio activo desde la forma farmacéutica ensayada. El propósito del siguiente trabajo es evaluar los perfiles de disolución de tres formulaciones diferentes en distintos medios durante cuatro horas. Los medios ensayados fueron: agua y buffer fosfato pH: 6.8. Las condiciones del ensayo fueron: disolución en 500 ml de medio a una temperatura de 37°C , aparato 2:100 rpm. La toma de muestra se realizó a los 30, 60, 90, 120 180 y 240 minutos. Las muestras fueron analizadas por H.P.L.C en fase reversa con detector U.V.- Vis y se cuantificó el ácido clorogénico presente en cada vaso. Resultados: El contenido de ácido clorogénico presente en las tres formulaciones fueron distintos (A: 0.86 mg/ comprimido ; B: 0.74 mg/ comprimido; C: 1.42 mg/ comprimido) En la liberación del principio ac-

tivo se observó una marcada diferencia en los dos medios de disolución utilizados. En agua la formulación A mostró a los 30 min. un $102.9 \pm 5.1\%$ de disolución en relación a un $5.8 \pm 6.6\%$ y $0.7 \pm 1.2\%$ para las formulaciones B y C respectivamente. A los 240 min. la formulación B y C solo alcanzaron un $58.8 \pm 3.9\%$ y $33.9 \pm 17.0\%$ de liberación de su contenido, respectivamente. En medio de buffer fosfato pH: 6.8 la disolución de las dos últimas formulaciones mejoró, pero siguieron siendo inferiores a las de la formulación A. A los 30 min. la disolución de A fue de $104.4 \pm 4.7\%$; la de B: $29.1 \pm 3.5\%$ y la de C no detectable. A los 240 min las formulaciones B y C sólo alcanzaron un $89.2 \pm 4.6\%$ y $75.3 \pm 25.8\%$ respectivamente. Dada las diferencias observadas entre los productos analizados, podemos concluir que no se comportan como equivalentes desde un punto de vista de su contenido y de su disolución.

633. (7434) PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE LIGARIA CUNEIFOLIA: EFECTO SOBRE DEFORMABILIDAD ERITROCITARIA Y EXCRECIÓN BILIAR. FERRERO, MARIANA; DOMINIGHINI, A; CROSETTI, D; RONCO, MT; ALVAREZ, ML; GURNI, A; WAGNER, M; CARNOVALE, CE; LUQUITA, ALEJANDRA

Biofísica- Cs. Médicas; Fisiología, Cs. Bioquím y Farm-UNR-CONICET. Farmacobotánica- Farmacia y Bioquímica-UBA

Demostamos que ratas tratadas con extracto crudo de *Ligaria cuneifolia* (Lc) por vía intraperitoneal (i.p.), incrementa el índice de rigidez (IR), disminuye el colesterol plasmático (Copl) y aumenta la excreción de sales biliares (SB) y Co biliar. Objetivo: analizar el efecto del tratamiento con proantocianidinas de distinto peso molecular extraídas de *Ligaria cuneifolia* (PLc) sobre las variables antes mencionadas. Se utilizaron ratas Wistar machos adultos Controlados (C) (n=6) inyectadas i.p. con Solución Fisiológica y Tratadas (T) (n=5) inyectadas i.p. con PLc 0,60 mg /100g peso corporal, cada 24 horas durante 3 días. Antes de la primera inyección, se extrajo sangre para la determinación basal de Copl. Al cuarto día las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal, i.p.), obteniéndose bilis por cateterización de colédoco y sangre por punción cardíaca. Se determinaron: Deformabilidad eritrocitaria (IR) por el método de filtración por membranas de microporos, Copl y Co biliar por método enzimático de esterasa-oxidasa, flujo biliar y excreción biliar de SB. Resultados (x media \pm ES). IR: C: $8,47 \pm 1,12$, T: $28,65 \pm 4,28^*$. Copl basal (mg %): C: $109,7 \pm 2,48$, T: $103,75 \pm 4,17$; Copl post-tratamiento: C: $111 \pm 2,30$; T: $90,45 \pm 5,57^*$. Excreción biliar: SB (nmol/min.g hígado): C: $47,56 \pm 3,65$, T: $76,90 \pm 5,80^*$; Co biliar: C: $2,77 \pm 0,12$, T: $3,24 \pm 0,15^*$. Flujo biliar (FB) (μ l/min. g hígado): C: $1,50 \pm 0,04$, T: $2,45 \pm 0,10^*$ (* $p < 0,05$ vs. C). El tratamiento con PLc (dosis 0.60 mg%) produce una disminución de la deformabilidad eritrocitaria (aumento del IR) que se asocia con el descenso de Co plasmático (r. -0,965, $p < 0,000025$, n: 9). La disminución del Co plasmático se debe al aumento de las velocidades de excreción biliar de Co y SB, que produce un aumento del FB. Estos resultados coinciden con los observados en el tratamiento con el extracto crudo de *Ligaria cuneifolia*.

634. (7856) ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA TÓPICA Y SISTÉMICA DE EXTRACTOS DE LITHRAEA MOLLEOIDES. GORZALCZANY, S; LOPEZ, P; COGOI, L; FERRARO, G; ACEVEDO, C

Cátedra de Farmacología FFyB- UBA, 2) Cátedra de Farmacognosia- FFyB - UBA

Lithraea molleoides (Vell.) Engl. (Anacardiaceae), "chichita" o "molle de Córdoba", es un árbol cuyas hojas, en forma de infusión o cocimiento, son utilizadas en medicina popular en el tratamiento de procesos inflamatorios, artritis y patologías respiratorias. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad antiinflamatoria de *L. molleoides* sobre extractos de diferente polaridad. Las partes aéreas de *L. molleoides* fueron extraídas

con diclorometano. El marco fue posteriormente extraído con etanol, del cual se obtuvieron cuatro fracciones. Las infusiones se prepararon según FA VI ed. La actividad antiinflamatoria se evaluó durante 5 horas, mediante el edema plantar en ratas inducido por carragenina y el edema auricular inducido en ratones por aplicación tópica de 12-O- tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). La administración de 100 mg/kg i.p. de la infusión y del extracto etanólico produjeron una inhibición del 46 y 39 % respectivamente de la respuesta inflamatoria en el edema plantar inducido por carragenina. La administración de 100 mg/kg i.p. de las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico demostró que la fracción con mayor actividad antiinflamatoria fue la extraída con acetato de etilo. Se obtuvo un 60% de inhibición del edema a partir de las 3 hs de la administración del flogógeno. La administración por vía oral de los extractos etanólico y cloruro de metileno a la dosis de 300 mg/Kg no presentaron actividad antiinflamatoria. En el edema auricular inducido por TPA el extracto etanólico produjo una inhibición del 21% de la respuesta inflamatoria control. Todas las fracciones obtenidas a partir de los extractos diclorometano y etanólico, inhibieron significativamente la producción del edema (30% a 90%). Los resultados obtenidos avalarían el uso que se le atribuye en medicina popular a *Lithraea Molleoides* como antiinflamatorio.

635. (7870) EFECTO ANTIHIPERTENSIVO Y VASORELAJANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE ACHYROCLINE SATUREIODES EN RATAS. GORZALCZANY, SUSANA BEATRIZ; HNATYZYN, O; FERRARO, G; ACEVEDO, C

Cátedra de Farmacología FFyB- UBA, Cátedra de Farmacognosia- FFyB- UBA

Achyrocline satureioides (Lam) DC (Asteraceae), conocida como "marcela", es un arbusto cuyas partes aéreas se utilizan en medicina popular para el tratamiento de diferentes patologías. En estudios previos demostramos que sus extractos producen relajación en músculo del cuerpo cavernoso. Por otra parte el análisis fitoquímico reveló una importante presencia de diferentes flavonoides (quercetina y sus derivados) cuya actividad vasodilatadora ha sido demostrada. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos cardiovasculares y vasodilatadores del extracto acuoso de *A. satureioides*. La infusión se preparó con las partes aéreas secadas, molidas y procesadas de acuerdo a la Farmacopea Argentina VI Ed. El efecto cardiovascular se evaluó en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) anestesiadas con pentobarbital 40 mg/kg. Para evaluar el efecto vasodilatador in vitro se utilizaron anillos de aorta torácica de rata. La administración del extracto acuoso produjo un descenso de presión arterial (D PAM= -31 ± 3 mmHg.) y un efecto bradicardizante (D FC= -25 ± 5 lpm). En los anillos aislados de aorta se analizó la actividad del extracto sobre la respuesta contráctil inducida por fenilefrina 10 (-7)M, ClK 80 mM y 12 miristato-13-acetato forbol (TPA) 10(-6) M. El extracto produjo los siguientes efectos: a) relajación dosis dependiente de la respuesta contráctil al ClK, llegando a una máxima inhibición del 85% a concentraciones de 10 mg/ml, b) disminución dosis dependiente de la respuesta contráctil de fenilefrina con una máxima inhibición del 70% a concentraciones de 10 mg/ml, c) disminución de la respuesta en anillos precontraídos con TPA a concentraciones de 20 mg/ml. Nuestros experimentos demuestran propiedades vasorelajantes y antihipertensivas del extracto de *Achyrocline satureioides*.

GASTROENTEROLOGÍA, METABOLISMO Y NUTRICIÓN 3

636. (6667) INMUNOLocalización DE MOTILINA Y SOMATOSTATINA EN ESTOMAGO DE LLAMA (LAMA GLAMA). ALZOLA, RICARDO; CASTAGNINO, ROSANA; LUPIDIO, CRISTINA; DE LA CRUZ, JUAN; DAURIA, PE-

DRO; GHEZZI, MARCELO; CASTRO, ALEJANDRA; RODRIGUEZ, JULIO

Dpto. de Cs. Biológicas. Fac. Cs. Veterinarias. UNICEN

La somatostatina es un polipéptido aislado del hipotálamo que ha sido inmunolocalizado en plexos nerviosos de la pared intestinal, en células endocrinas de la mucosa digestiva y en los islotes pancreáticos; por su parte la motilina, reguladora de la motilidad gastrointestinal, es secretada por células endocrinas del tracto digestivo de diferentes especies de vertebrados tanto superiores como inferiores. En trabajos previos identificamos en distintas regiones de los compartimentos del estómago de llama (proximal, intermedio y distal), la presencia de cromograninas A, un marcador común a todas las células endocrinas. El objetivo del presente trabajo fue identificar la presencia de Motilina y Somatostatina en las regiones del compartimento distal del estómago de llama cromogranina positivo. Se analizaron 4 regiones del compartimento distal de 3 ejemplares de llamas provenientes de la cátedra de Anatomía de la FCV-UBA, las muestras fueron fijadas por 48 hs. en Bouin y embebidas en parafina, obteniéndose cortes seriados de 5 μ . Los cortes fueron inmunoteñidos con anticuerpos policlonales antimotilina y antisomatostatina en una dilución 1/1000. Para su detección se empleó el complejo avidina/biotina y peroxidasa (ABC) y el sustrato peroxidasa diaminobencidina (DAB) para su revelado. Del análisis y observación microscópica se visualizaron marcaciones positivas a somatostatina y negativas para motilina. La presencia de somatostatina se evidenció en células con citoplasma granular localizadas en el epitelio glandular, sobretudo entre las células epiteliales ubicadas en la base de las glándulas, en células presentes en el tejido conectivo de la mucosa y en células de los plexos nerviosos submucoso y mientérico. Se concluye que el compartimento distal del estómago de la llama presenta células positivas al anticuerpo anti-somatostatina no detectándose la presencia de células positivas a anti-motilina.

637. (6968) CAMBIOS FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES POST RADIACION EN LA GLANDULA SUBMANDIBULAR (GSM) DE RATA. DE LA CAL*, C; MOHN, C; IRIBARNE***, M; SUBURO***, A; LO NOSTRO****, F; CASAL*****, M; RETTORI**, V; ELVERDÍN*, JC**

Facultad de Odontología, FOUBA, CEFyBO-CONICET**, F. AUSTRAL***, FCEyN****, Htal. Roffo*****.*

Previamente describimos que la radiación ionizante (Rx) a nivel de cabeza y cuello, induce incrementos en los niveles de PGE2 y alteraciones del equilibrio apoptótico/proliferativo en la GSM. Nuestro objetivo fue analizar a tiempos cortos los efectos de la Rx sobre la peroxidación de lípidos (LPX), como indicador de la destrucción de membranas por radicales libres. Además a los 180 días post Rx estudiamos la respuesta secretoria mediada por noradrenalina (NA) y su correlación con los cambios estructurales mediante estudios histológicos. Se utilizaron ratas hembras adultas Wistar (300 grs) divididas en grupos (n: 6): Irradiados (GRx) y Control (GC). El GRx se irradió con una dosis de 15Gy con bomba de cobalto. La LPX de membrana se determinó mediante la técnica de T-BARS a 1, 4 y 12 Hs post Rx y GC. A los 180 días post Rx, mediante curvas dosis respuesta (CDR) se evaluó la capacidad secretoria inducida por NA (1, 3, 10 y 30 μ g/kg) y se realizaron cortes histológicos de GSM coloreados con hematoxilina y eosina. Los resultados revelaron un incremento significativo en la LPX a la hora y 12 Hs post Rx (16.21 \pm 1.65 y 14.8 \pm 2.38 nMol/mg prot, p<0.05*) con respecto al GC (7.57 \pm 0.59 nMol/mg prot) A los 180 días post Rx la CDR a NA fue desplazada hacia la derecha y la respuesta máxima obtenida con 30 μ g/kg de NA disminuyó un 80% en el GRx, esta disminución en la secreción salival puede deberse a las alteraciones morfológicas en la GSM, donde los acinos mucosos disminuyeron en un promedio de 9.86 \pm 0.55 por campo GC a 4.86 \pm 0.46 GRx (p<0.001***) y los conductos estriados aumentaron de 1.81 \pm 0.35 GC a 4.27 \pm 0.41 por campo en GRx(p<0.001**). Estos resultados demuestran que la Rx de GSM incrementa el estrés oxidativo

simultáneo con la respuesta inflamatoria post Rx. La disminución en la saliva podría deberse a las alteraciones estructurales permanentes que inhiben la capacidad reparativa de los acinos, componente formador de la saliva, en la GSM.

638. (7087) MORFOMETRIA DE CELULAS INMUNOREACTIVAS A CROMOGRANINA A EN EL COMPARTIMIENTO DISTAL DEL ESTOMAGO DE LA LLAMA (LAMA GLAMA). GHEZZI, MARCELO; ALZOLA, RICARDO; ORTEGA, HUGO; LUPIDIO, CRISTINA; LORENTE, J; CASTRO, ALEJANDRA; RODRIGUEZ, JULIO

Dpto. de Cs. Biológicas. Fac. Cs. Veterinarias. UNICEN. Campus Universitario. Tandil (7000) Bs. As.; Cátedra de Histología y Embriología. Fac. Cs. Vet. UNL..Esperanza. Santa Fe

Las cromograninas han sido utilizadas en otras especies como un marcador de células endocrinas, entre ellas de las células epiteliales de la mucosa del estómago. El objetivo del presente trabajo fue efectuar el análisis morfométrico de las células positivas a cromogranina del compartimento distal de la Llama. Se analizaron muestras de cuatro regiones del compartimento distal, provenientes de la Cátedra de Anatomía de la FCV-UBA. Las muestras fueron fijadas en solución Bouin y procesadas por las técnicas histológicas corrientes. Los cortes obtenidos de aproximadamente 5 μ de espesor fueron inmunoteñidos con un anticuerpo policlonal anticromogranina (Laboratorios Zymed). Las inmunomarcaciones se efectuaron mediante el sistema streptavidina-biotina-peroxidasa y se utilizó como cromógeno diaminobencidina. El análisis digital de imágenes fue efectuado utilizando el sistema Image-Pro Plus 4.1.0 (Media Cybernetics, silver Spring, MA, USA), conectado a un PC Pentium III Intel. Las imágenes fueron generadas a través de una video cámara Sony ExwaveHAD, conectada a un microscopio Olympus CH2 con fuente de energía estabilizada. La región del istmo del compartimento distal del estómago presenta un promedio de células inmunomarcadas por área de 128,5 \pm 18,22, la región intermedia de 91,6 \pm 32,90, la región pilórica de 54,2 \pm 9,89 y la región fúndica de 48,6 \pm 9,43. La región del istmo presentó la mayor cantidad de células inmunomarcadas por unidad de superficie y son las células más regulares en su aspecto. La región intermedia presentó las células con mayor perímetro. La región pilórica presentó un área celular inmunomarcada por las cromograninas mayor pero con poca cantidad de células por μ 2. La densidad óptica de las regiones intermedia, fúndica y pilórica presentaron una intensidad similar de inmunomarcado para cromograninas y la densidad óptica integrada fue mayor para las regiones intermedia y pilórica.

639. (7495) CARACTERIZACIÓN DE LA ACCIÓN CITOTÓXICA DE STX2B SOBRE LA ABSORCIÓN DE IONES Y AGUA EN COLON HUMANO. LEVI, LORENA; PISTONE CREYDT, VIRGINIA; ZOTTA, ELSA; IBARRA, CRISTINA

Lab Fisiopatogenia, Depto Fisiología, Facultad de Medicina, UBA

E.coli enterohemorrágicas (EHEC) productora de toxina Shiga (Stx) coloniza el colon humano y causa diarrea acuosa, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. En resultados previos observamos que Stx2 es capaz de inhibir la absorción neta de agua (Jw) del colon humano sin alterar la corriente de cortocircuito (Isc) luego de 1h de incubación de una manera dosis y tiempo dependiente. Paralelamente, daña la superficie de la mucosa y un tercio superior de la cripta colónica (Fiorito et al. Dig. Dis. Sc. 45,480, 2000). Recientemente se demostró que la subunidad B de Stx2 (Stx2B) también inhibe el transporte de agua a través del epitelio colónico pero no produce daño histológico (Pistone et al. Braz. Jour. Med. Biol. Res. 37,799, 2004). El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la inhibición de Jw producida por Stx2B para conocer como contribuye esta subunidad a la fisiopatología de la diarrea acuosa observada en los pacientes infectados con EHEC. Para ello, fragmentos de mucosa colónica

humana se montaron en una cámara de Ussing modificada y se registraron simultáneamente Jw e Isc, en ausencia y presencia de amiloride seguido de incubación con Stx2B. La preincubación con 10(-3)M amiloride produjo una significativa disminución de Jw y aumento de Isc en los primeros 30min de incubación. El agregado posterior de 300 ng/ml Stx2B no modificó significativamente los parámetros medidos. En ausencia de amiloride, 300 ng/ml Stx2B inhibe el Jw sin modificar la Isc. Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción de Stx2B sobre el Jw es dependiente de un movimiento de Na(+) amiloride sensible. El intercambiador neutro Na(+)-H(+)/Cl(-)-CO(3)H(-) amiloride sensible descrito en la superficie del colon humano podría entonces estar inhibido por Stx2B y ser responsable de la inhibición del flujo de agua producido por la subunidad B.

640. (7534) LA DIETA RESTRINGIDA MODIFICA LA RELACIÓN NOS-COX EN GLÁNDULAS SUBMAXILARES AISLADAS DE RATAS PREPÚBERES. LANFRI-AGUILAR, NORMA; CAMPOS, LILIANA; LINARES, JORGE; FINKELBERG, ANA

Cátedra De Fisiología- Facultad De Odontología. UNC

Se estudia la posible participación de NOS y COX sobre el metabolismo de la glucosa por medición de la producción de (14)CO[2] a partir de U(14)C glucosa en trozos aislados de glándula submaxilar (SMX) de ratas prepúberes debido a) a una dieta restringida, 50% de la dieta habitual durante 21 días (PDR); b) por no haber alcanzado la madurez debido a su edad (PE). En ambos grupos el metabolismo de la glucosa es mayor que en ratas adultas con alimentación normal ($p < 0.01$). La incorporación al medio de indometacina (AAS:10(-4) M, indometacina: 10(-6) M), bloquea el metabolismo de la glucosa exclusivamente en PDR. ($P < 0.001$; $P < 0.005$ respectivamente). En animales PE el agregado de nitroprusiato de sodio 400 μ M, dador exógeno de NOS, aumenta el metabolismo de la glucosa, efecto que se revierte con NAME (500 mM). Por el contrario nitroprusiato no produce efecto en (PDR). La valoración de los niveles de NOS en PDR y PE son mayores ($P < 0.0001$) que controles adultos con alimentación normal (AD). En PDR los valores de NOS disminuyen ($P < 0.001$) en presencia de aminoguanidina (500 μ M) que no tiene efecto en PE. La producción de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico en animales prepúberes, demuestra: En PDR aumentan los valores de PgE[2] y disminuye PgF[2alfa], efecto inhibido por amino-guanidina. En PE, los valores de PgE[2] son menores y los de PgF[2alfa] están elevados, sin modificarse por la presencia de aminoguanidina. Se puede concluir que el incremento del metabolismo de la glucosa en ratas prepúberes en relación a adultos, se produce por distintas vías: Cuando la causa es la edad sería a través de la vía Arginina-óxido nítrico mientras en prepúberes por baja alimentación participan la fracción inducible de NOS, COX con incremento PGE[2].

641. (7667) INTERACCION ENTRE FACTOR NATRIURETICO ATRIAL Y SECRETINA SOBRE LA VIA DEL AMP CICLICO EN ACINOS PANCREATICOS AISLADOS. SABBATINI, MARIA EUGENIA; VATTA, MARCELO (1); DAVIO, CARLOS (2); BIANCIOTTI, LILIANA G

(1) *Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), FFyB, UBA* (2) *Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA*

El factor natriurético atrial (ANF) potencia "in vivo" la respuesta secretora de secretina (S) mediado por activación del receptor NPR-C acoplado a fosfolipasa C (PLC) sin afectar niveles basales ni estimulados por forskolina de AMPc. En estudios posteriores se observó que en presencia de mayores dosis de S, el ANF reducía la respuesta secretora de S. El objetivo del presente estudio fue determinar en acinos pancreáticos aislados los efectos de ANF sobre la vía del AMPc estimulada por S y los posibles mecanismos involucrados. Los resultados se expresan como $X \pm SEM$ (pmol/mg de proteínas); * y #: $p < 0.05$ vs control (C) o S, respectivamente. ANF no modificó niveles basales de AMPc pero anuló la respuesta de S (C: 2.89 ± 0.20 ; S: 15.21 ± 0.90 ;

ANF: 2.57 ± 0.30 ; ANF+S: 2.56 ± 0.23) . Este efecto no se observó en presencia de otros agonistas secretores pancreáticos que señalizan a través de AMPc como el agonista β -adrenérgico isoproterenol o el agonista H2 amtamina. El efecto de ANF sobre la respuesta de S fue mimetizado por un agonista específico de NPR-C (4-23 ANP) (4-23 ANP: 2.79 ± 0.56 ; 4-23 ANP +S: 2.74 ± 0.86)# e inhibido por U73122 (inhibidor de PLC) (U: 2.17 ± 0.78 ; U+ANF+S: 14.06 ± 1.15 *) o GF-109203 (inhibidor de PKC) (GF: 4.71 ± 0.65 ; GF+ANF+S: 12.56 ± 0.93 *) pero no modificado por L-NAME (inhibidor de NOS) ni de KT 5023 (inhibidor de PKG). Estos resultados indican que el ANF inhibe selectivamente a través del receptor NPR-C la formación de AMPc estimulada por S a través de la activación de PLC y PKC. Asimismo sugieren que ANF a determinadas concentraciones ejercería un rol protector sobre la funcionalidad del páncreas exocrino al reducir la respuesta secretora estimulada por S.

642. (7674) EFECTO DE LA BAJA CALIDAD DE LA PROTEÍNA DE LA DIETA SOBRE LAS POBLACIONES CELULARES INTESTINALES. PALLARO, ANABEL; VIDUEIROS, SILVINA ; FERNANDEZ, INÉS; ROUX, MARÍA E; SLOBODIANIK, NORA

Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA; 1Lab. Inmunol.Cel.Cát.Fisiopatología

Trabajos previos indican que la administración de dietas de baja calidad proteica provoca frenado de la proliferación celular y alteración en la diferenciación y maduración celular en timo de ratas en crecimiento. Objetivo: Estudiar el efecto de la administración de dietas de baja calidad proteica sobre las poblaciones linfocitarias B y T de intestino. Ratas Wistar de la Cátedra de Nutrición se destetaron a los 21 días de edad (Pi: 38.3 ± 5.2). Recibieron durante 18 días dieta a base de harina de maíz al 6.5 % de proteína y completa en los demás nutrientes esenciales según recomendaciones del AIN (Grupo M). Como control se utilizó ratas alimentadas con dieta stock (grupo C). Finalizado el período experimental, los animales fueron pesados (Pf), se calculó la Velocidad de ganancia de peso (VGP) como $((Pf - Pi/n \text{ días}) / (Pi + Pf/2)) \times 100$ y se les extrajo el intestino. Se obtuvieron cortes histológicos por la técnica de Saint Marie y se caracterizaron las poblaciones linfocitarias B IgA+ y T CD5+ por la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Se leyó el número de linfocitos en lamina propia (LP) e intraepitelio (LIE) en 30 campos. Análisis estadístico: test t de dos colas. Resultados M vs C ($X \pm DE$, n:10): 1) Pf: 43.5 ± 7.7 vs 116.9 ± 15.7 ; $p < 0.01$ 2) VGP: 0.8 ± 0.3 vs 5.7 ± 0.6 ; $p < 0.01$ 3) Linfocitos B IgA+ en LP: 65.2 ± 17.82 vs 107.5 ± 18.91 ; $p < 0.01$ 4) Linfocitos T CD5+ en LP: 46.6 ± 18.79 vs 101.5 ± 5.20 ; $p < 0.0004$ 5) LIE T CD5+ : 2.8 ± 1.9 vs 5.66 ± 4.62 , ns. Se observó diferencia significativa en el peso corporal, en la velocidad de ganancia de peso, en las poblaciones B IgA+ y T CD5+ de lamina propia de intestino entre el grupo M y C. Si bien no se observó diferencia significativa en la población T CD5+ de intraepitelio entre M y C, M tendió a valores menores. La dieta de baja calidad proteica provoca daños en las poblaciones celulares B y T de intestino, lo que demuestra una alteración en la inmunidad de mucosas como consecuencia del desequilibrio en la dieta. Subsidiado por UBACYTB120, PIP02243, PIP02855

643. (7709) EL PEPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C (CNP) ESTIMULA LA SECRECIÓN PANCREÁTICA EXOCRINA A TRAVÉS DEL NERVI VAGO Y LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR NPR-C. SABBATINI, MARIA EUGENIA; VATTA, MARCELO S (1); VILLAGRA, ALBERTO (2); BIANCIOTTI, LILIANA G.

(1) *Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET) FFyB, UBA*, (2) *Dep. de Análisis Clínicos, FFyB, UBA*

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos periféricos de CNP sobre la secreción pancreática basal y las posibles vías y receptores involucrados. Ratas SD se canularon en vena yugular y en el conducto hepático a nivel de la ampolla

de Vater, previo by-pass de la secreción biliar al intestino. Los resultados son $X \pm SEM$ a los 30min (μ l, μ g o mEq/min/100 g) (*: $p < 0.05$). CNP incrementó la secreción pancreática (C: control) (C: 0.15 \pm 0.008; CNP 0.5 μ g: 0.24 \pm 0.02*; CNP 1 μ g: 0.32 \pm 0.03*; CNP 2 μ g: 0.50 \pm 0.05*), la excreción de proteínas (C: 2.3 \pm 0.1; CNP 0.5 μ g: 1.2 \pm 0.2; CNP 1 μ g: 6.4 \pm 0.4*; CNP 2 μ g: 20.6 \pm 1.7*) y la de cloruro (C: 13.7 \pm 0.6; CNP 0.5 μ g: 25.7 \pm 0.32*; CNP 1 μ g: 30.4 \pm 1.3*; CNP 2 μ g: 36.2 \pm 0.1*). El efecto de CNP (1 μ g) sobre el flujo pancreático y la excreción de cloruro disminuyó por vagotomía (VT) (flujo: VT: 0.07 \pm 0.01; VT+CNP: 0.20 \pm 0.02; cloruro: VT: 9.0 \pm 1.0; CNP+VT: 15.0 \pm 1.3) y hexametonio (HX) (flujo: HX: 0.100 \pm 0.005; HX+CNP: 0.18 \pm 0.03; cloruro: HX: 9.8 \pm 0.7; HX+CNP: 14.2 \pm 2.0), sin modificar la respuesta del CNP sobre la excreción de proteínas. El ligando específico del receptor NPR-C, 4-23 ANP (1 μ g), mimetizó los efectos del CNP sin modificar la excreción de cloruro (flujo: 4-23 ANP: 0.25 \pm 0.009*; 4-23 ANP+CNP: 0.30 \pm 0.02*; proteínas: 4-23 ANP: 5.4 \pm 0.6*; 4-23 ANP+CNP: 6.8 \pm 0.6*). La vagotomía no modificó los efectos de 4-23 ANP. La administración de bloqueantes adrenérgicos y de L-NAME no afectaron la secreción pancreática estimulada por CNP. Estos resultados indican que CNP estimula la secreción pancreática exocrina y la excreción de proteínas de manera dosis-dependiente a través del receptor NPR-C, siendo la excreción de cloruro mediada por el nervio vago.

644. (7775) REGULACIÓN CENTRAL DE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA POR EL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C: ROL DEL NERVI VAGO Y DEL GMP CICLICO. SABBATINI, MARÍA EUGENIA; RODRÍGUEZ, MYRIAN; CORBO, NATALIA; VATTA, MARCELO S. (1); BIANCIOTTI, LILIANA G.

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. (1) Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA

En un estudio previo se demostró que la administración central de péptido natriurético tipo C (CNP) incrementa la secreción pancreática exocrina independiente de la vía adrenérgica, nitrérgica y de los receptores muscarínicos. Se ha descrito que el nervio vago presenta otros transmisores además de la acetilcolina. En este trabajo se estudió la participación de la vía vagal y el posible neurotransmisor involucrado así como también las posibles interacciones del CNP a nivel central con CCK-8 y secretina. Ratas Sprague-Dawley (250-280g) se canularon en ventrículo lateral (icv) y en el conducto hepático a nivel de la ampolla de Vater, previo by-pass de la secreción biliar al intestino. Los resultados se expresan como $X \pm SEM$ (μ l/min/100 g) (ANOVA, «t» test modificado por Bonferroni) (*: $p < 0.05$). La vagotomía troncular (VT) anuló el efecto del CNP (100 ng) (C: control) (30': C: 0.124 \pm 0.008; VT: 0.09 \pm 0.01; CNP: 0.32 \pm 0.03*; CNP+VT: 0.09 \pm 0.004) mientras que hexametonio (HX) lo redujo un 40 % (30': HX: 0.08 \pm 0.009; CNP+HX: 0.18 \pm 0.02*). La administración conjunta icv de CNP (50 ng) y CCK-8 (2 μ g) o secretina (SC) (0.05 μ g) produjo un efecto aditivo sobre la secreción pancreática (CNP: 0.27 \pm 0.02*; SC: 0.24 \pm 0.03*; SC+CNP: 0.34 \pm 0.01*; CCK: 0.35 \pm 0.04*; CNP+CCK: 0.57 \pm 0.06*). La administración de (D-p-cloro-Phe,Leu)-VIP (0.5 μ g/Kg/min) no modificó la respuesta de CNP. Para determinar los receptores centrales involucrados se administró icv 4-23 ANP, ligando del receptor NPR-C, no observándose cambios sobre la secreción pancreática basal o estimulada por CNP. El 8-Br-GMP (1 μ g) icv mostró un incremento en la respuesta de CNP (50 ng) (30 min: 8-Br-GMPc: 0.17 \pm 0.01; 8-Br-GMPc+CNP: 0.37 \pm 0.04). El CNP administrado a nivel central estimula la secreción pancreática exocrina a través del nervio vago sin participación del VIP. Los receptores centrales NPR-B y/o NPR-A, que señalizan a través de GMPc, estarían involucrados en la respuesta de CNP.

645. (7844) EFECTO BIFÁSICO DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C SOBRE LA SECRECIÓN PANCREÁTICA ESTIMULADA POR SECRETINA. SABBATINI, MARÍA EUGENIA; CORBO, NATALIA; DAVIO, CARLOS A. (1); VATTA, MARCELO S. (2); BIANCIOTTI, LILIANA G.

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; (1) Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA (2) Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), FFyB, UBA.

El péptido natriurético tipo C (CNP) incrementa la secreción pancreática exocrina de manera dosis dependiente. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la interacción entre CNP y los principales secretagogos pancreáticos (CCK-8, secretina (SC), y carbacol (CC)). Ratas Sprague-Dawley (250-280g) se canularon en vena yugular y en conducto hepático a nivel de la ampolla de Vater, previo by-pass de la secreción biliar al intestino. Los resultados son $X \pm SEM$ (ANOVA-test de t modificado por Bonferroni) (*: $p < 0.05$ vs secretagogo). El estudio de segundos mensajeros se realizó en acinos pancreáticos aislados. CNP (1 y 2 μ g) potenció la secreción pancreática inducida por SC 0.5 U, pero redujo de manera dosis dependiente la secreción evocada por SC 1 y 2 U, (μ l/min/100 g de peso corporal) (SC 0.5 U: 0.258 \pm 0.03; SC 1U: 0.40 \pm 0.02; SC 2U: 0.44 \pm 0.02; SC 0.5U+CNP1 μ g: 0.5 \pm 0.02*; SC 1U+CNP1 μ g: 0.30 \pm 0.03*; SC 2U+CNP1 μ g: 0.24 \pm 0.03*; SC 0.5U+CNP2 μ g: 0.40 \pm 0.07*; SC 1U+CNP2 μ g: 0.28 \pm 0.03*; SC 2U+CNP2 μ g: 0.15 \pm 0.03*). Asimismo, CNP incrementó la secreción pancreática estimulada por CCK-8 y por CC, observándose un efecto aditivo (CCK-8: 10pmol: 0.18 \pm 0.02; 50pmol: 0.32 \pm 0.03; 104pmol: 0.54 \pm 0.04; CCK10pmol+ CNP1 μ g: 0.36 \pm 0.02*; CCK50pmol CNP1 μ g: 0.42 \pm 0.03*; CCK104pmol+ CNP1 μ g: 0.76 \pm 0.08*) (CC 0.01 μ mol: 0.16 \pm 0.02 ; 0.1 μ mol: 0.28 \pm 0.01; 1 μ mol: 0.41 \pm 0.02; CC 0.01 μ mol+CNP1 μ g: 0.27 \pm 0.04; CC 0.1 μ mol+CNP1 μ g: 0.38 \pm 0.04; CC 1 μ mol+CNP1 μ g: 0.59 \pm 0.06*). El CNP aumentó la hidrólisis de fosfoinosítidos sin producir cambios en los niveles basales de AMPc (*: $p < 0.05$ vs % control) (CNP: 1 nM: 87.2 \pm 5.2; 10 M: 170.3 \pm 7.2*; 100 M: 201.2 \pm 9.0*). El CNP produjo un efecto bifásico sobre la secreción pancreática estimulada por secretina y mostró un efecto aditivo sobre la inducida por CCK-8 y CC siendo su acción mediada por la vía de los fosfoinosítidos.

646. (7914) EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE NIÑOS CONCURRENTES A UNA ESCUELA ALBERGUE A TRAVÉS DE UN PARÁMETRO BIOQUÍMICO FUNCIONAL NO INVASIVO. PERRIS, PAULA; SLOBODIANIK, NORA; PALLARO, ANABEL

Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Trabajos previos realizados en 2002, que evaluaron el estado nutricional de niños concurrentes a una escuela albergue, demostraron que 100% de la población no cubría los requerimientos energéticos ni proteicos y entre 30-90% el de otros micronutrientes. 8% de la población total mostró deficiencia de peso, 13% retraso de talla y 8% y 18% tuvo Peso/Talla (grado 1) para niños y niñas, respectivamente. 17% niños y 11% niñas mostraron sobrepeso. Se consideró importante evaluar el estado nutricional a través de un parámetro bioquímico funcional. Objetivo: Estudiar el estado nutricional de niños que concurren a una escuela albergue a través de la determinación de inmunoglobulina A (IgA) en saliva. Se determinó IgA total en saliva sin estimular en 20 niñas y 25 niños escolares (46% de la población de la escuela N° 4170, paraje Las Higueiras, Departamento de Iruya, Salta) La saliva fue recolectada en ayunas y refrigerada hasta su transporte y procesado en la Cátedra de Nutrición; la IgA fue determinada por inmunodifusión radial cuantitativa sobre placas DIFFU-PLATE (BIOCIENTIFICA S.A.). Los resultados se compararon (test t) con valores de referencia de Felii/Slobodianik realizados por la misma metodología y para el mismo grupo etario. Resultados: En la siguiente tabla se presentan los datos de IgA para población total y por sexos, expresados como media \pm DE ($^{\circ}p < 0.01$ con respecto a la referencia)

Grupo	IgA niños	IgA niñas	IgA población total	Referencia
Media \pm DE	5.5 \pm 3.8 $^{\circ}$	4.9 \pm 4.1 $^{\circ}$	5.4 \pm 3.9 $^{\circ}$	16.9 \pm 8.2

Conclusión: Se observó diferencia significativa en la IgA en saliva de la población total de niños con respecto a valores de referencia. No se observaron diferencias entre niños y niñas. Estos datos indicarían que la inmunidad a nivel de las mucosas estaría afectada, lo cual es coincidente con las gripes a repetición y toma de antibióticos que se observaron en las fichas médicas de los niños.

647. (8067) PARTICIPACION DEL ZINC EN LA MODULACION DEL SISTEMA INMUNE EN EL HIPOTIROIDISMO EXPERIMENTAL. KLECHA, ALICIA (1); ZUBILLAGA, MARCELA (1); SALGUEIRO, JIMENA (1); LEONARDI, NATALIA (1); BOCCIO, JOSÉ (1); PIÑEYRO, ADRIANA (1); GENARO, ANA MARÍA (1,2); CREMASCHI, GRACIELA (1,2)

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; (2) Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO) - CONICET

Existen evidencias sobre la regulación bidireccional entre el eje tiroideo y el sistema inmune. Dado que diversas manifestaciones clínicas de las carencias nutricionales de Zn y Fe se relacionan con alteraciones inmunológicas y de la función tiroidea, hemos estudiado si la modulación experimental del eje tiroideo pone a su vez en evidencia alteraciones del metabolismo de estos minerales. Se emplearon ratones BALB/c eutiroideos (Eu); hipertiroideos (T4, tratados 5 veces por semana durante un mes con 20 ug de Tiroxina), hipotiroideos (PTU, 0.05% propiltiouracilo en agua de bebida/15 días); e hipotiroideos tratados 6 días con 4 ug de T3 diarios (PT3). Se determinaron los niveles hormonales para confirmar el status tiroideo, hemoglobina en g/dl (Eu=13.9±1.8; PTU=14.5±1.7; PT3=15±1.5; T4=18.7 ± 1.4*, p<0.05), hematocrito % (Eu= 41±3; PTU= 39±2 ; PT3= 43±2; T4= 49±3*, p <0.05), contenido hepático en ppm de Fe (Eu= 125±19; PTU= 114±21 ; PT3= 89±20; T4= 113 ± 23) y Zn (Eu= 41± 13; PT3= 37±12; T4= 35±15, PTU= 69±11*, p<0.001) y contenido en ppm de Zn en fémur (Eu= 94±11; PT3= 97±10; T4= 98±9, PTU= 71±12*, p<0.001). Se observó un aumento significativo del contenido hepático de Zn, con una reducción de Zn óseo en el hipotiroidismo respecto del eu- e hipertiroidismo. Estas alteraciones dejan de evidenciarse al revertir el hipotiroidismo con T3. Animales deficientes en zinc (alimentados con dietas con menos de 3 ppm de Zn) mostraron una menor proliferación linfocitaria por estimulación de mitógenos T (LT) y B (LB) selectivos (% Inh respecto de animales controles, LT: 35±5; LB: 45±4). Resultados similares se obtuvieron en animales hipotiroideos. Los resultados sugieren la existencia de una alteración en la distribución compartamental del Zn en el hipotiroidismo que puede alterar su disponibilidad y por lo tanto contribuir a la modulación negativa del sistema inmune que se produce en este status tiroideo.

GASTROENTEROLOGÍA, METABOLISMO Y NUTRICIÓN 4

648. (6636) ACTIVIDAD NORADRENERGICA HIPOTALAMICA EN UN MODELO ANIMAL DE INGESTA SUBOPTIMA. COMPAGNUCCI, CV¹; COMPAGNUCCI, GE¹; ROIG, MC¹; HOPE, SI²; DI NUNZIO, AS²; BIANCIOTTI, L³; ELVERDIN, JC¹; VATTA, MS²; BOYER, PM¹

¹Cátedra de Fisiología, FOUBA, Cátedras de ²Fisiología y ³Fisiopatología (IQUIMEFA-CONICET), FFyB, UBA

Existe evidencia de la participación de la actividad noradrenérgica central en la regulación de la función gonadal. En estudios previos observamos retraso puberal en un modelo animal de ingesta subóptima (ED). En el presente trabajo se estudió la actividad noradrenérgica: captación y liberación de noradrenalina (NA) y actividad de tirosina hidroxilasa (TH) en hipotálamo anterior (HA) de ratas macho ED, como uno de los posibles mecanismos centrales responsables de la disfunción gonadal. Ratas macho Wistar al destete se dividieron en 2 gru-

pos: Control (C) y ED (18 animales/grupo). C recibió una dieta equilibrada ad libitum. ED recibió un 80% de la dieta consumida por C, durante 4 semanas (T4). El peso (P) y la longitud corporales (L) de ED vs. C disminuyeron significativamente a T4 (p<0,001); P/L Z-score=0,12±0,15 (x±DS), correspondiente a la categoría antropométrica de adecuado. En HA, la captación y liberación de NA disminuyeron un 21% (p<0,001) y 33% (p<0,001), y la actividad de TH aumentó un 64% (p<0,001) en ratas ED vs. C. No se observaron diferencias significativas en la actividad noradrenérgica entre HA derecho e izquierdo en ambos grupos. Los resultados obtenidos sugieren que el desbalance de la actividad noradrenérgica en el hipotálamo anterior podría ser responsable, al menos en parte, del retraso puberal en este modelo de desnutrición armónica.

649. (6835) EFICACIA DEL TRASPLANTE DE HEPATOCITOS (TH) PARA EL TRATAMIENTO DE FALLA HEPÁTICA FULMINANTE (FHF) INDUCIDA EN RATAS. MEDIAVILLA, MARÍA GABRIELA (1); SIGOT, VALERIA (1); FURNO, GRACIELA (2); RODRÍGUEZ, JOAQUÍN VALENTÍN (3); GUIBERT, EDGARDO ELVIO (1)

(1) *Biología Molecular, (2) Estadística, (3) Farmacología Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR*

El trasplante de hepatocitos (TH) provee soporte metabólico durante la falla hepática manteniendo al paciente hasta el trasplante (OLT) o, aún, evitándolo. El tratamiento de falla hepática fulminante (FHF) con TH no mostró eficacia en los escasos ensayos clínicos informados y está poco estudiado en modelos animales. Nos propusimos evaluar la eficacia del TH para aumentar el tiempo de supervivencia en un modelo de FHF en ratas. La FHF se desarrolló por inyección i.p. de paracetamol (AAP) (1,1 g/Kg p.c.). El TH se realizó a las 22 h de la intoxicación mediante infusión intraesplénica de 20-35 x 10⁶(66) hepatocitos. Se estudiaron 4 grupos experimentales de ratas con FHF: (I) ratas que no recibieron trasplante; (II) ratas trasplantadas con hepatocitos, (III) hepatocitos incluyendo nitroprusiato de sodio (NP) 100 µM, y (IV) hepatocitos transfectados para expresar ferredoxina reductasa (EC 1.18.1.2) más NP. La supervivencia de las ratas fue: I) 28,1 ± 12,7 h (n=13); II) 33 ± 11,5 h (n=4); III) 87,7 ± 79,5 h (n=12) y IV) 87,7 ± 111,1 h (n=3). Para I y II el 100% de las ratas falleció por causa de la FHF, mientras que el 25% y el 33,3% revirtieron completamente el cuadro para III y IV, respectivamente. La comparación estadística de las curvas de supervivencia (X²(2)) mostró mayor supervivencia para el grupo III que el I (P=0,0041) y razones de riesgos de 0,731 para II/I y de 0,242 para III/I. El análisis de los parámetros bioquímicos demostró que las transaminasas séricas descendieron a niveles normales a las 48 h del TH en las ratas supervivientes del grupo III. Histológicamente, hubo retorno a la morfología normal y se pudo observar la implantación de los hepatocitos trasplantados. El TH prolonga el tiempo de supervivencia de ratas con FHF provocada con AAP. Cuando el TH se realiza agregando el vasodilatador NP 100 µM su eficacia aumenta significativamente y aún revierte el cuadro de FHF en al menos un 25% de los animales.

650. (6873) LA PICA DURANTE EL EMBARAZO Y SU RELACION CON LA DEFICIENCIA DE HIERRO Y ZINC. LÓPEZ, LAURA BEATRIZ; LANGINI, SILVIA (2) H; FLEISCHMAN, SILVANA (2); WEISSTAUB, ADRIANA (2); ORTEGA SOLER, CARLOS (3) R; PITA DE PORTELA, MARÍA (2) L

Escuela de Nutrición. Ftdad de Medicina (UBA) (2) Ftdad. de Farmacia y Bioquímica (UBA), (3) Hosp.D.Paroissien, La Matanza, Bs As

La pica, trastorno de consumo compulsivo de sustancias no nutritivas (tierra, hielo, tiza, etc.) se asocia frecuentemente a deficiencias minerales, especialmente en gestantes en las que hemos constatado elevada prevalencia (22%) (Htal D Paroissien, La Matanza). Por ello, se comparó el estado nutricional respecto al hierro (Fe) y al zinc (Zn) en puérperas con pica (GP) (n=

71) y sin pica (grupo control, GC, n=71) asistidas en dicho Hospital. Ambos grupos presentaron similares características en edad, peso pregestacional, paridad y nivel socio-cultural. En sangre venosa, obtenida post-parto, se determinó: Hematocrito (Hto), recuento de glóbulos rojos (GR), volumen corpuscular medio (VCM), Hemoglobina (Hb) (contador electrónico MEGA), protoporfirina eritrocitaria (PE)(Piomelli) y Zn (ZnS) (Espectrometría de Absorción Atómica). En suero: Fe (FeS) y porcentaje de saturación de transferrina (ST) (Wiener). Los resultados evidenciaron en GP vs GC: 1) valores estadísticamente diferentes ($p < 0.02$) de: VCM (fL): 89.1 ± 8.1 vs. 92.5 ± 5.5 ; ZnS ($\mu\text{g/mL}$ de GR): 6.72 ± 1.35 vs 7.24 ± 1.02 y PE ($\mu\text{g/dL}$ GR): 54.9 ± 27.1 vs. 43.5 ± 21.0 ; 2) mayor prevalencia de anemia, según dos de tres indicadores anormales: 29.6% vs 14.1% ($p < 0.025$), con un Odds Ratio de 2.56 (IC95% = $1.03 - 6.48$); 3) mayor porcentaje de mujeres con cifras indicativas de deficiencia de ZnS: Odds Ratio de 2.85 (IC95% = $1.24 - 6.60$). En el análisis por regresión logística, la presencia de pica fue predictora de bajos valores de VCM y elevadas cifras de PE así como de un mayor riesgo de presentar menores valores de ZnS. La presencia de pica se asocia a deterioro del estado nutricional con respecto al Fe y al Zn. Su diagnóstico, consistente en efectuar un interrogatorio adecuado, contribuirá a detectar una causa importante de riesgo nutricional, frecuentemente ignorada durante la atención prenatal, permitiendo implementar estrategias de intervención y educación nutricional. Subsidio B009, UBA

651. (6914) AGREGADO DE EPA Y DHA EN DIETAS A BASE DE MAÍZ: ESTUDIO EN MODELO EXPERIMENTAL EN RATA EN PERIODO DE CRECIMIENTO ACTIVO. FERNÁNDEZ, INES; SLOBODIANIK, NORA

Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires. ARGENTINA

Trabajos previos demostraron que el desequilibrio nutricional causado por la administración de una dieta a base de maíz al 6.5% de proteína a ratas al destete, afecta el normal desarrollo del timo. La suplementación con 24 mg/día de EPA y DHA logró revertir este efecto evaluado a partir del recuento de timocitos y de la población celular T total W3/13+. El objetivo de este trabajo es analizar si estas observaciones se correlacionan con cambios en los niveles de EPA y DHA en suero y timo. Ratas bien nutridas de la cepa Wistar al destete, recibieron durante 10 días, dieta de maíz al 6.5% de proteína sin (M) y con (M24) un suplemento de 77.8 mg/día de aceite de pescado de origen comercial (Regulip®, Raffo); dicho aceite aporta 24 mg/día de EPA + DHA. Al finalizar el período experimental, los animales fueron sacrificados. Se extrajo sangre para la separación del suero y el timo. La concentración de EPA y DHA, se determinó por cromatografía gaseosa expresándose los resultados como porcentaje de ácidos grasos totales. M24 registró concentraciones séricas de EPA y DHA superiores y estadísticamente diferentes a M ($p < 0.05$), (EPA: 1.27 ± 0.47 vs 0.10 ± 0.01 ; DHA: 3.70 ± 1.90 vs 0.59 ± 0.48). Los niveles en timo no fueron estadísticamente diferentes entre M24 y M (EPA: 0.26 ± 0.27 vs 0.22 ± 0.12); sin embargo, M24 presentó una tendencia a niveles mayores en DHA (0.51 ± 0.70 vs < 0.10). El incremento observado en los niveles séricos de EPA y DHA y la tendencia de una mayor concentración de DHA en timo, sugiere que la suplementación con estos ácidos grasos, revierte el efecto del desequilibrio nutricional provocado sobre este órgano. Parcialmente financiado por CONICET (PIP - 02243) y la Universidad de Buenos Aires (B-060).

652. (6938) GLÁNDULA SUBMANDIBULAR: PARTICIPACIÓN EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA PERIODONTAL EN LA RATA. ELVERDIN, JUAN CARLOS; VACAS, MARIA IRENE; MANDALUNIS, PATRICIA; FERNANDEZ SOLARI, JOSE JAVIER; CHIARENZA, ANA PATRICIA; DE LA CAL, CAROLINA; LUCHELLI, MARIA AMALIA; RETTORI, VALERIA

Cát. de Fisiología, Fac. Odontología, UBA, Cat. de Bioquím. Gral. y Bucal e Histología, FOUBA, CEFyBO, CONICET

Múltiples enfermedades y tratamientos terapéuticos se expresan con hiposaliva o xerostomía y se asocian con patologías bucales. En el presente trabajo se estudió la participación de las glándulas submaxilares (GSM) en la respuesta inflamatoria periodontal en la rata. Se utilizaron ratas Wistar (300 g) a las que se extirparon las GSM (GSMx). Dos semanas después de GSMx u operación simulada (Sham) se indujo periodontitis experimental (PE) mediante ligadura con hilo, alrededor de los primeros molares inferiores que se dejó hasta el sacrificio (72 hs). Se midió: % de caries, volumen óseo y la presencia de infiltrado leucocitario (cortes mesio-distales de mandíbulas) y PGE2 por RIA en tejidos mucogingivales alrededor de los primeros molares. La GSMx 1) Determinó la aparición de caries en un 15% de los molares con respecto a los sham, 2) incrementó PGE2 ($p < 0.01$) en los controles, pero no modificó el aumento significativo ($p < 0.01$) inducido por PE (GSMx: 267.8 ± 7.9 ; Sham: 148.6 ± 15.8 , GSMx PE: 512.6 ± 63.3 ; Sham PE: 671.7 ± 156.5 , Media \pm ES, n=4-7, pg/mg de tejido), 3) aunque el período estudiado no permite ver descenso significativo en el volumen óseo por PE (control GSMx: 48.33 ± 7.42 , control Sham: 47.66 ± 1.92 , PE GSMx: 28.93 ± 8.94 , PE Sham: 35.45 ± 5.49 , Media \pm ES, n=4-6, % Vo/Vt), en los animales con GSMx la pérdida ósea y el infiltrado leucocitario fue marcado en la región apical radicular. En la rata, GSMx incrementa la aparición de caries y la irritación gingival. En la PE, la mayor pérdida relativa de volumen óseo y el mayor infiltrado leucocitario en la zona apical interradicular en ausencia de GSM podría reflejar un avance de la PE desde las corticales alveolares, sin daño aún detectable en el área evaluada. Estos resultados confirman la importancia de las GSM en el mantenimiento de la salud bucal en relación al desarrollo de caries y probablemente de enfermedad periodontal.

653. (7303) DESARROLLO DE UN HÍGADO BIOARTIFICIAL CON ESFEROIDES DE HEPATOCITOS PORCINOS. APLICACIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE FALLA HEPÁTICA FULMINANTE. LORENTI, ALICIA; BARBICH, MARIANA; SORROCHE, PATRICIA; CEBALLOS, CANDELA; MELE, ESTEBAN; VAZQUEZ, JUAN CARLOS; BONFIGLIO, FRANCISCO; ARGIBAY, PABLO

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

Los denominados hígados bioartificiales (BAL) han demostrado su utilidad en la detoxificación de pacientes en falla hepática. Sin embargo, su utilidad en términos de control de la presión intracraneana no ha sido bien documentada. Objetivo: evaluar en un modelo animal de falla hepática (FHF) con hipertensión endocraneana un BAL diseñado localmente cuyo componente biológico está formado por esferoides de hepatocitos porcinos. Material y métodos: Los hepatocitos fueron aislados por triple perfusión y cultivados con agitación durante 2 días. La FHF fue producida mediante una unión entre las venas porta y cava con ligadura de la arteria hepática. Se evaluó la variación de la presión intracraneana (PIC) y la capacidad de detoxificación de amonio. La PIC partió de un valor basal normal de 14 U, alcanzó un valor de 31 a las 5 h pos-FHF, momento en que se inició la circulación, y bajó nuevamente a 14 U después de 5 h de tratamiento con el dispositivo. El amonio bajó de $286 \mu\text{g/dl}$ hasta $150 \mu\text{g/dl}$. El ácido láctico descendió de 10.6 mM hasta 4.2 mM en el mismo tiempo. La estructura y viabilidad de los esferoides se mantuvieron conservadas, lo cual fue analizado por tinción con azul tripan pre y post tratamiento. A las 6 h de tratamiento, se interrumpió la circulación, lo cual provocó el inmediato aumento de la PIC y el amonio, y la muerte del animal después de 30 minutos. Estos resultados preliminares nos permiten concluir que el sistema descrito de hígado bioartificial podría cumplir funciones de detoxificación y descenso de la presión intracraneana en pacientes en falla hepática fulminante.

654. (7340) ACTIVIDAD DE ADENOSINA DEAMINASA EN SUERO, EN UN GRUPO DE PACIENTES CON ANOREXIA NERVIOSA. FELIU, MARÍA SUSANA; VITORES SPINETTA,

VALERIA; MATZKIN, VALERIA(1); BELLO, MABEL(2); SLOBODIANIK, NORA

Cátedra de Nutrición.Fac.de Farmacia y Bioquímica,UBA. (1) King's College London (UK) ; (2)ALUBA,Hosp.C.B. Udaondo (Bs. As.)

Trabajos en modelo experimental, han demostrado la rápida respuesta de la actividad de Adenosina Deaminasa (ADA) en timocitos, a los desequilibrios nutricionales y posterior recuperación. Esto señala a ADA como potencial indicador de estado nutricional. Algunos autores han comprobado su aumento en suero de pacientes con diferentes patologías, que comprometen los mecanismos de defensa. En pacientes con trastornos de la conducta alimentaria(TCA) se ha reportado compromiso del sistema inmune. Objetivo: determinar la actividad de ADA en suero de pacientes con TCA. Se reclutaron 26 mujeres con Anorexia Nervosa (AN) concurrentes a ALUBA; se seleccionaron mujeres controles del público en general, del mismo medio socioeconómico, excluyéndose aquellas que presentaron un Índice de Masa Corporal (IMC) menor a 17.5, que padecían o habían padecido enfermedades crónicas, AN o Bulimia Nervosa y las que estaban embarazadas. Se determinó Peso corporal (Kg) y talla (m), calculándose el IMC (kg/m²). La sangre se extrajo en ayunas, por punción de pliegue de codo y sobre el suero separado por centrifugación se determinó la actividad de ADA (U/L) por el método de Giusti y Galanti .Los resultados (X ± DE) se presentan en la tabla (β,p<0.02, test de T)

Variables	Grupo AN	Grupo Control
Edad	23.5±9.0	23.8±4.3
IMC (kg/m ²)	17.9±1.8 (β)	20.5±2.2
ADA(U/L)	25.7±8.2 (β)	21.0±4.6

Se observa aumento en la actividad de ADA al comparar el grupo AN con el control. Estos resultados avalarían la hipótesis de proponer, en los estudios de nutrición, la determinación de la actividad de ADA como un indicador funcional relacionado con los mecanismos de defensa. Parcialmente financiado por UBA (B-060) y CONICET (PIP-02243)

655. (7949) DISTRIBUCION DE TAMAÑO DE SUBFRACCIONES DE HDL EN LA POSTMENOPAUSIA. MUZZIO, MARIA LUZ; BERG, GABRIELA; ZAGO, VALERIA; BRITES, FERNANDO; BASILIO, FRANCISCO(1); LOPEZ, GRACIELA; SANGUINETTI, SILVIA; WIKINSKI, REGINA; SCHREIER, LAURA

Lab Lípidos-Lipoproteínas, Fac Farmacia y Bioquímica, UBA. (1) Servicio Ginecología, Hospital Durand

En la postmenopausia aumenta el riesgo cardiovascular, si bien el descenso de col-HDL en plasma no es significativo. HDL es una familia heterogénea de partículas. No se conocen los factores que regulan el tamaño de subfracciones de HDL. En estudios previos hemos comprobado que HDL ricas en triglicéridos (TG) tienen menor afinidad con lipasa hepática. La proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP) contribuye al remodelamiento de HDL. Objetivo: determinar la distribución de subfracciones de HDL según su tamaño y relacionarlo con factores que condicionaran esa distribución. Se evaluaron 20 mujeres postmenopáusicas (PM), sin tratamiento hormonal, hipolipemiente o que altere el metabolismo lipoproteico, y 14 controles premenopáusicas sanas (Pre). Se registró peso, altura y cintura, se midió glucosa e insulina, perfil lipídico-lipoproteico y actividad de CETP con 3H-C-HDL3 como sustrato. Se separaron subfracciones de HDL por PAGE 8-27%, midiendo densitográficamente 3 subfracciones en orden decreciente de tamaño: grande (HDLg), intermedia (HDLi), pequeña (HDLp). La fracción predominante fue HDLi. PM mostró mayor actividad de CETP (media±DS 127±47 vs 95±33%/ml.h p<0.05), mayor proporción de HDLg (30,5±14,8 vs 19,7±10,7% p<0.03) y menor de HDLi (38,6±12,8 vs 52,8±13,4% p<0.004) que Pre. HDLi correlacionó inversamente con TG, cintura, BMI, HOMA (r=-0.32, -0.4, -0.6, -

0.32, p<0.05 respectivamente). Sin embargo HDLg correlacionó directamente con TG (r=0.41) BMI (r=0.46), cintura (r=0.35), y HOMA (r=0.32) p<0.05. El aumento de HDLg se asoció con parámetros característicos del síndrome metabólico asociado a PM. CETP también favorecería la formación de HDLg en PM. A su vez se interpreta que HDLg no constituye buen sustrato de lipasa hepática, lo que no permitiría efectuar en forma completa y eficiente el transporte reverso del colesterol. Aún cuando el col-HDL no desciende después de la menopausia, su capacidad antiaterogénica sería menor

656. (7986) CONTRIBUCIÓN DE LA ACCIÓN DE HDL AL STATUS ANTIOXIDANTE EN DEPORTISTAS. ZAGO, VALERIA; SANGUINETTI, SILVIA; VERONA, JULIÁN; WIKINSKI, REGINA; SCHREIER, LAURA; BRITES, FERNANDO

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Es sabido que el ejercicio físico aeróbico se asocia con aumento del estrés oxidativo. En trabajos anteriores demostramos que individuos sometidos a actividad física periódica presentan mayores defensas antioxidantes como respuesta adaptativa. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antioxidante de HDL sobre LDL en deportistas de alto rendimiento en comparación con controles sedentarios. Se estudiaron 18 hombres triatletas (29±6 años) y 18 controles sedentarios (27±6 años) sin tratamiento con drogas que pudiesen afectar el metabolismo lipoproteico, antioxidantes o anabólicos. Se evaluó la oxidabilidad de HDL y LDL in vitro inducida con Cu(2+) y la capacidad de HDL para inhibir la oxidación de LDL (%). Se midió la actividad de la enzima antioxidante paraoxonasa (PON) ligada a HDL y se estimó el fenotipo de cada paciente (QQ, QR, RR). La oxidabilidad de HDL y LDL aisladas, %I y la actividad PON no fueron diferentes entre deportistas y controles. Sin embargo, al analizar al grupo con fenotipo PON heterocigota QR (11 triatletas y 11 controles), %I fue mayor en deportistas que en controles (49,4±22,7 vs 30,8±18,8%; p<0,05). La oxidabilidad de LDL fue similar, mientras que la de HDL fue mayor en deportistas que en controles (TBARS- HDL = 41,7±7,3 vs 32,8±7,6 nmolMDA/mg prot.; p<0,05; y máxima producción de dienos conjugados-HDL = 196,9±21,6 vs 181,0±24,2%; p<0,05). En triatletas, los triglicéridos-HDL mostraron una tendencia hacia valores mayores (4,1±1,3 vs 3,3±0,7%; p=0,067) y correlacionaron positivamente con la oxidabilidad de HDL (r=0,58; p<0,01). En el subgrupo QR de triatletas, HDL protegió más eficientemente contra la oxidación de LDL. Se interpreta que la mayor oxidabilidad de HDL sería resultante de la captación de lipoperóxidos provenientes de LDL. Además, la mayor proporción de triglicéridos-HDL favorecería su propia oxidación. La HDL contribuiría al aumento de las defensas antioxidantes en deportistas de alto rendimiento.

657. (8031) EFECTO DEL ESTRADIOL 17BETA-GLUCURÓNIDO (E17G) SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSPORTADORA DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 (MRP2) EN INTESTINO DELGADO DE RATAS HEMBRAS. VEGGI, LUIS; RUIZ, MARÍA LAURA; VILLANUEVA, SILVINA ; CATANIA, VIVIANA; LUQUITA, MARCELO; PELLEGRINO, JOSÉ; OCHOA, ELENA; ROMA, MARCELO ; MOTTINO, ALDO

IFISE-Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas (CONICET-UNR)

E17G, un estrógeno involucrado en la etiología de la colestasis del embarazo, produce en la rata una colestasis aguda y reversible, parcialmente debida a inhibición de Mrp2 hepática. En la membrana apical de enterocitos Mrp2 también transporta aniones orgánicos, posibilitando la secreción de compuestos tóxico-reactivos a la luz intestinal. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de E17G sobre la actividad de Mrp2 intestinal. Se trabajó con saquitos intestinales evertidos del yeyuno (7,5 cm) provenientes de ratas hembras, los cuales fueron expuestos a E17G 30 μM, o solvente en el grupo control

durante todo el experimento. La actividad de transporte de Mrp2 se evaluó a distintas concentraciones de 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB, 10, 30 y 100 μM). Este compuesto es convertido por la glutatión S-transferasa intestinal a 2,4-dinitrofenil-S-glutathion (DNP-SG), un sustrato modelo de Mrp2. El DNP-SG secretado al medio exterior de los saquitos (mucoso) se determinó por HPLC entre los 5-25 min, o a los 25 min en muestras del medio interno (seroso) y en homogenados de los mismos. El tratamiento con E17G disminuyó la velocidad de excreción inicial de DNP-SG hacia el lado mucoso (nmol/min), a las concentraciones de CDNB de 10 μM (de 1.2 ± 0.9 a 0.6 ± 0.2 , $p < 0.05$) y de 30 μM (de 2.5 ± 1.2 a 1.3 ± 0.6 , $p < 0.05$), no así a 100 μM . La excreción acumulativa de DNP-SG en el medio exterior (nmol/25 min) disminuyó también a las concentraciones de CDNB de 10 μM (de 17.2 ± 1.8 a 9.3 ± 1.1 , $p < 0.05$) y 30 μM (de 47.3 ± 11.5 a 25.2 ± 5.1 , $p < 0.05$), aunque no a 100 μM de CDNB. Ni el transporte de DNP-SG hacia el lado seroso ni el contenido tisular de DNP-SG se vieron afectados a ninguna de las concentraciones de CDNB estudiadas. Concluimos que E17G disminuye la actividad de transporte de Mrp2 en intestino, posiblemente a través de un mecanismo de tipo competitivo.

658. (8051) DAPSONA (DDS) PRODUCE ESTRÉS OXIDATIVO Y ALTERA LA FUNCIÓN ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE EN EL HÍGADO DE LA RATA. VEGGI, LUIS; CROCENZI, FERNANDO; ROMA, MARCELO; MOTTINO, ALDO

Universidad Nacional de Rosario

DDS, un fármaco utilizado en el tratamiento de lepra, produce metahemoglobinemia (por estrés oxidativo generado por su metabolito N-hidroxilado) y hepatotoxicidad (por un mecanismo desconocido). El objetivo de este trabajo fue indagar si DDS produce estrés oxidativo en el hígado de la rata, evaluado a través de la determinación de la excreción biliar de glutatión oxidado (GSSG) y la formación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se examinó también si tales alteraciones se asocian a cambios en la actividad de enzimas antioxidantes, y si las mismas dependen de la formación del metabolito N-hidroxilado, el cual solo se genera perceptiblemente en ratas machos. Para ello, se administró i.p. DDS (60 mg/Kg/día $n=4$) a ratas Wistar macho y hembras, durante 4 días, o su vehículo (propilenglicol) en los controles (C, $n=4$). DDS produjo un aumento de la excreción biliar de glutatión oxidado (nmol/min/g híg.) en ratas macho (de 0.22 ± 0.06 a 2.05 ± 0.29 , $p < 0.05$), sin variarlo en ratas hembras (DDS: 0.19 ± 0.04 , C: 0.18 ± 0.08 ; $p > 0.05$). En ambos casos no se modificó el contenido de glutatión hepático. El nivel de TBARS en homogenados de hígado (nmol de malondialdehído/100 mg prot.) aumentó en ratas macho tratadas con DDS (de 1.4 ± 0.3 a 3.1 ± 1.3 , $p < 0.05$), pero no en hembras (DDS: 1.13 ± 0.30 , C: 0.93 ± 0.40 ; $p > 0.05$). DDS disminuyó sólo en ratas macho la actividad (U/mg prot.) de las enzimas catalasa (de 1043 ± 166 a 712 ± 200 , $p < 0.05$), glutatión peroxidasa (de 0.44 ± 0.03 a 0.38 ± 0.04 , $p < 0.05$) y superóxido dismutasa (de 116 ± 10 a DDS 99 ± 9 , $p < 0.05$). Concluimos que DDS produce estrés oxidativo y daño de membrana por peroxidación lipídica en el hígado de rata. Este aumento en la producción de radicales libres se agrava por la alteración de las principales enzimas involucradas en la defensa antioxidante. Finalmente, tales alteraciones estuvieron condicionadas a la formación de su metabolito N-hidroxilado, ya que los efectos deletéreos se observaron sólo en ratas macho.

659. (8137) ENZIMAS DEL NEUTROFILO: MIELOPEROXIDASA (MPO) Y ELASTASA (E-PMN) EN PANCREATITIS AGUDA (PA) EXPERIMENTAL. DI CARLO, M; BUSTOS, D; YAPUR, V; BUSTOS, M; CARMONA, M; OTERO, G; TISCORNIA, O; NEGRI, G

Dpto. Bioquímica Clínica, FFyB, Hospital de Clínicas, UBA

La PA es un proceso inflamatorio con una fisiopatología compleja, aún en estudio. Se desconoce la totalidad de los factores etiológicos capaces de desencadenarla. Su diagnóstico y tratamiento requiere de la comprensión de los mecanismos

patogénicos para racionalizar el uso de los elementos terapéuticos que hoy se encuentran a nuestro alcance. Objetivos: Estudiar en el tejido pancreático modif. en los seg. cefálico y corporo-caudal: índice gramos de páncreas/Kganimal entero; observ. microscópica (score histopatológico) y Actividad de MPO y E-PMN, relacionándolas con el grado de severidad. Se partió de 52 ratas, Machos: PA (11), Control(9) y Hembras: PA(12), Control(10). Se les desencadenó la PA de acuerdo con el método de Pfeffer clásico modificado. Se determinó el peso húmedo de la glándula. En homogenato se determinó: MPO y E-PMN. En biopsias se justipreció el score (frecuencia a 10x). analizando: edema, inflamación, necrosis y hemorragia. Resultados: Luego de la inducción de PA, a las 24 hs del Pfeffer: machos como hembras, aumentaron sig. el peso de ambos segmentos. Tanto el índice como la mortalidad post-operatoria fue sig. mayor en los machos ($p < 0,05$). Entre sexos no hay diferencia sig. para edema y hemorragia o tipo de lesión. Las hembras presentan elevado en forma débilmente sig. score inflamación ($p=0,074$), y los machos presentan un score necrosis sig. más elevado ($p < 0,05$). En los machos se observan focos de necrosis, mientras que las hembras mantienen indemne la estructura pancreática o con ligera infiltración leucocitaria (inflamación). Las enzimas del neutrófilo se encuentran elevadas en las hembras y en el segmento cefálico ($p < 0,05$). Los machos desarrollan una PA más severa que las hembras. Se puede considerar a MPO y E-PMN, como indicadores del grado de infiltración leucocitaria, lesión tisular y del proceso inflamatorio

660. (8139) LIPASA: UNA ENZIMA PECULIAR. UN ANÁLISIS EXPERIMENTAL Y CLÍNICO QUE CERTIFICAN SU DEPENDENCIA COLINÉRGICA Y HORMONAL. TISCORNIA, O; HAMAMURA, S; OTERO, G; LOPEZ, F; DI CARLO, M; YAPUR, V; NEGRI, G; WAISMAN, H; LUCENTINI, M; LEHMANN, E; TISCORNIA-WASSERMAN, P

Programa de Estudios Pancreáticos - Hosp.de Clínicas-UBA

Ratificar que la Lipasa Pancreática (LP) en sangre y contenido duodenal y secreción bilio-pancreática, en la rata y en el hombre, es una enzima colinérgica y hormonal dependiente (Secretina, Estradiol). Materiales, Métodos - Resultados: I.- En ratas macho ($n=79$): a) Desnervación colinérgica pancreática (vaguectomía, solarectomía, sección y reanastomosis perivateriana), aguda y crónica, inducen disminución LP, fenómeno revertido por superposición de alcoholismo crónico. b) Reflejo vago-vagal de Håkanson (ligadura pilórica) y el "manoseo" antro-píloro-duodenal aumentan LP en sangre. c) Sección y reanastomosis antro-fúndica (SRAF, úlcus antral y gastrinemia aumentada) inducen elevación LP, d) SRAF más Ranitidina, un mayor aumento LP. e) Fundectomía más Håkanson y Gastrinemia induce un aumento mayor LP basal. f) Estradiol dos semanas genera aumento en secreción basal bilio-pancreática. II.- En Humanos: comparando test de Secretina en hombres y mujeres (mayores 45 años, $n=38$), el sexo masculino revela: mayor concentración y débito de LP en contenido duodenal. El tono colinérgico intrapancreático ejerce un rol permisivo leve, interactuando con la Secretina en la síntesis y secreción de LP por parte de las células acinares del "pancreón". Una interacción similar se desenvuelve entre el Estradiol y la Secretina. La gastrina ejercería un rol potenciador. En el hombre mayor de 45 años, el incremento secretorio de la LP se atribuye al hiperestrogenismo relativo característico de esta etapa de la vida.

HEMATOLOGÍA 2: CLÍNICA Y PATOLOGÍA

661. (6496) DETECCIÓN MOLECULAR DEL COMPROMISO MEDULAR EN GAMMAPATIAS MONOCLONALES. DENNINGHOFF, VALERIA; BOSALEH, ANDREA; GARCIA, ALEJANDRO; RESCIA, CARLA; AVAGNINA, ALEJANDRA; ELSNER, BORIS

Servicio de Patología. CEMIC. Argentina

Entre el 20 y el 30% de las gammopatías monoclonales de significado incierto desarrollarán mieloma múltiple al cabo de 10 años indicando una condición premielomatosa. La gammapatía monoclonal de significado incierto presenta un componente monoclonal sin evidencia de mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis primaria u otros desórdenes. El mieloma múltiple es una gammapatía monoclonal maligna resultante de la expansión de un clon de células B que secretan inmunoglobulinas. Representa el 15% de los procesos neoplásicos hematológicos y se caracteriza por la presencia de una proteína monoclonal sérica, destrucción esquelética con lesiones osteolíticas, fracturas patológicas, dolor óseo, hipercalcemia y anemia. El diagnóstico de ambas se basa en la combinación de características patológicas, radiológicas y clínicas. El objetivo del presente trabajo es establecer la utilidad clínica de la detección de clonalidad por técnicas de biología molecular. Se estudiaron retrospectivamente treinta y dos pacientes, siete con diagnóstico de mieloma múltiple y veinticinco con gammapatía monoclonal en estudio los cuales fueron divididos en cuatro grupos basados en los datos clínicos y los resultados de Citometría de flujo. En el grupo de pacientes con Citometría de flujo no diagnóstica, se realizó la detección de los reordenamientos de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas mediante PCR, detectándose monoclonalidad en el 57% de los casos. El estudio de los reordenamientos de los genes de las cadenas pesadas de las IgH mediante técnicas de biología molecular incrementó la sensibilidad de detección de monoclonalidad por lo tanto la detección de una población clonal en pacientes con gammapatía monoclonal de significado incierto podría considerarse un factor predictor de enfermedad.

662. (7287) ESTANDARES PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE TRANSCRIPTOS BCR-ABL POR RT-PCR. TEDESCHI, F.A.; GREGORET, V.; ZALAZAR, F.E.

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Univ. Nac. Litoral. Avda. Freyre 2150 (3000) Santa Fe.

La información mas relevante para evaluar la respuesta al tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica se obtiene al cuantificar la expresión del gen Bcr-Abl por RT-PCR. Es deseable contar con estándares que: a) puedan ser sometidos a las mismas variables que las muestras, b) se amplifiquen con la misma eficiencia que éstas, c) evalúen los rearreglos más frecuentes y d) sean independientes del cultivo de líneas celulares humanas. Objetivo: obtener y evaluar estándares sintéticos de ARN para cuantificar el transcripto quimérico Bcr-Abl. Metodología: Con los plásmidos recombinantes pGEM-T-b3a2 y pGEM-T-b2a2 (obtenidos por ligado de fragmentos de amplificación correspondientes a los rearreglos moleculares b3a2 y b2a2), se transformaron E. coli DH5-alfa. La selección inicial de clones recombinantes se realizó por su capacidad de crecer en un medio con ampicilina. La confirmación de estos clones se realizó por análisis del ADN plasmídico digerido con enzimas de restricción y por PCR. Con los plásmidos seleccionados se realizó transcripción in vitro con la enzima SP6 RNA Pol. Los ARN obtenidos se purificaron con un rendimiento de 10(9) moléculas/ul de reacción. Con éstos se realizaron diluciones para: a) Evaluar la eficiencia de amplificación y b) construir curvas de trabajo para los ensayos de RT-PCR cuantitativa competitiva. Cantidades crecientes de los estándares fueron mezclados con una masa constante de ARN total de las muestras a analizar. La mezcla fue sometida a transcripción reversa y los ADN complementarios fueron amplificados por PCR. Los amplicones generados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa y las imágenes obtenidas analizadas densitométricamente. Los ARN obtenidos in vitro (por RT-PCR) generaron fragmentos del tamaño esperado, con eficiencias de amplificación similares. En las curvas de cuantificación, un rango dinámico de trabajo fué obtenido entre 10(3) y 10(6) moléculas, con coeficientes de variación menores al 8%, siendo apropiado para su utilización en reacciones cuantitativas para el transcripto Bcr-Abl.

663. (7456) EFECTO DE LA HOMOCISTEINA SOBRE LA ANTITROMBINA Y EL COFACTOR II DE LA HEPARINA. ZANARO, NOEMÍ LUJÁN; QUINTANA, IRENE; LAURICELLA, ANA MARÍA; CASTAÑON, M. MERCEDES; KORDICH, LUCÍA; SASSETTI, BEATRIZ

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

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido con un grupo tiol, producto intermediario del metabolismo de la metionina. Niveles plasmáticos aumentados de Hcy se han asociado a estados protrombóticos. La antitrombina (AT) y el Cofactor II de la Heparina (CHII) son los inhibidores fisiológicos plasmáticos de trombina más importantes. Nuestro objetivo fue evaluar los posibles efectos de Hcy sobre AT y CHII. Se incubó durante una hora a 37°C una mezcla de plasmas normales citratados con distintas concentraciones de Hcy (25 y 50mM) o PBS (n=8). Se determinó la actividad de AT y CHII mediante un método amidolítico empleando el sustrato cromogénico S-2238. También se realizó la inmunolectroforesis bidimensional (IEB) de los plasmas incubados aplicando en la primera dimensión 50 UI/ml de heparina para AT, 2 mg/ml de dermatán sulfato para CHII y en la segunda dimensión el anticuerpo monoclonal específico correspondiente. Los valores de las actividades de AT y CHII hallados se indican en la Tabla (media \pm desvío estándar). Los perfiles de AT obtenidos por IEB en presencia de Hcy mostraron un patrón diferente al del control: presentaron dos picos siendo el catódico de mayor altura que el anódico. No se obtuvieron diferencias en los perfiles de CHII respecto al control.

	Control (PBS)	Hcy 25 μ g/ml	Hcy 50 μ g/ml
AT (%)	100 \pm 20	87 \pm 9	83 \pm 8
CH II (%)	110 \pm 16	98 \pm 15	85 \pm 12

De los resultados obtenidos podemos concluir que la presencia de altas concentraciones de Hcy produce alteraciones en el perfil electroforético de AT y una disminución en las actividades de AT y CHII. Este descenso aumentaría el riesgo trombótico en pacientes con niveles de AT y CHII en el límite inferior normal.

664. (7512) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ADAMTS-13 EN PACIENTES CON ACCIDENTE CEREBRO VASCULAR (ACV). FARIAS, CRISTINA; KEMPFER, ANA CATALINA; SÁNCHEZ LUCEROS, ANALÍA; AMARAL, MARÍA MARTA; VERA, EZEQUIEL; LAZZARI, MARÍA ANGELA

Instituto de Investigaciones Hematológicas «Mariano R. Castex»

El factor von Willebrand (VWF) media la adhesión de plaquetas en los sitios de injuria vascular, la cual depende del tamaño de los multímeros del VWF. La ADAMTS-13 cliva al VWF plasmático regulando su actividad. Las mutaciones en la ADAMTS-13 producen una severa deficiencia de esta enzima en pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica. Su deficiencia también podría contribuir a la trombosis en pacientes que no tienen PTT. En un trabajo previo, se encontró que 3 de 70 pacientes con ACV, tenían una disminución parcial de la ADAMTS-13. De los 3 pacientes, el que presentó una severa disminución de ADAMTS-13 (17%), tuvo ACV recurrente. En base a estos hallazgos determinamos la actividad de ADAMTS-13 en 11 pacientes con un episodio y 1 paciente con múltiples episodios de ACV, entre 28 y 53 años de edad y en 18 hombres normales. Medimos la actividad de ADAMTS-13, según técnica de Furlan modificada, sobre VWF purificado humano con detección por unión del VWF residual a colágeno según la técnica de Gerritsen. La media de actividad de ADAMTS-13 en los pacientes (100%, 65-147%) no mostró diferencias significativas con respecto a los controles (95%, 46-184%). Dado que se reportó una baja incidencia de deficiencia de la ADAMTS-13 en pacientes con ACV (3/70), nuestros resultados en 11 pacientes son los esperados.

Los bajos niveles de ADAMTS-13 en el paciente con ACV recurrente reportado sugería que la determinación de la ADAMTS-13 brindaría una información importante para el pronóstico de esta patología, pero en nuestro paciente con múltiples episodios de ACV no se registró ADAMTS-13 disminuida (117%). Nuestros resultados no sugieren que la deficiencia de ADAMTS-13 pueda estar involucrada en la etiología del ACV.

665. (7584) EVALUACIÓN DE ADAMTS-13 Y FACTOR VON WILLEBRAND EN PERROS DOBERMAN PINSCHERS. KEMPFER, ANA CATALINA (1); KRIMER, ALEJANDRO (2); FARÍAS, CRISTINA (1); CARBALLO, GONZALO (1); AMARAL, MARÍA MARTA (1); VERA, EZEQUIEL (1); LAZZARI, MARÍA ANGELA (1)

(1) Instituto de Investigaciones Hematológicas «Mariano R. Castex». (2) Kam Biotec

En un estudio publicado con 159 perros Doberman Pinschers se concluye que el 89.3% son portadores de la enfermedad de von Willebrand (VWD). Respecto a los niveles de ADAMTS-13 en perros no existe información. Por lo que evaluamos la ADAMTS-13, el VWF:Ag y los multímeros de VWF en 7 perros (machos y hembras) entre 10 meses y 5 años de edad. Medimos la actividad de ADAMTS-13, según técnica de Furlan modificada, sobre VWF purificado humano con detección por unión del VWF residual al colágeno según técnica de Gerritsen. Determinamos el VWF:Ag por ELISA y los multímeros del VWF por electroforesis en SDS-1% agarosa y detección inmunoenzimática. En todos los estudios utilizamos anticuerpo anti-VWF humano. Los resultados pueden observarse en la Tabla.

Perros	% VWF:Ag (55-223)	% Multímeros grandes (95-115%)	% Multímeros extragrandes (-5-15%)	% ADAMTS-13 (46-184)
1	64	94	-6	72
2	46	94	-6	74
3	42	96	-4	72
4	36	100	35	33
5	45	93	-7	102
6	9	no ponderable	no ponderable	74
7	10	no ponderable	no ponderable	71

El perro 1 tiene niveles de VWF:Ag dentro del rango normal humano, los perros 2, 3 y 5 serían heterocigotas para VWD y los perros 6 y 7 serían homocigotas para VWD. Los niveles de ADAMTS-13 de los perros mencionados son similares a los humanos. El perro 4 tendría ciertas características de púrpura trombocitopénica trombótica: presencia de multímeros extragrandes y disminución de la ADAMTS-13.

666. (7604) EFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA SOBRE LA PERMEABILIDAD DE GELES DE FIBRINA. LAURICELLA, ANA MARÍA; OBERHOLZER, VICTORIA; SASSETTI, BEATRIZ; CORTI, HORACIO (1); KORDICH, LUCÍA; QUINTANA, IRENE

Lab. Hemostasia y Trombosis, Dpto. Qca. Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. (1) Dpto. Qca. Inorgánica, FCEyN. UBA.

Las redes de fibrina obtenidas en presencia de homocisteína (Hcy) muestran, por microscopía electrónica de barrido, una estructura compacta, ramificada y difícil de lisar. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la Hcy sobre "geles" de fibrina mediante estudios de permeabilidad. Se evaluaron 2 sistemas: A) pool plasmático incubado (inc:1 h a 37°C) con soluciones de Hcy ([Hcy]_{final} = 50; 250 y 500 µM). B) fibrinógeno (Fg) y/o FXIII incubados (inc:1 h a 37°C) con Hcy 500 µM. En todos los casos se utilizó solución fisiológica (SF) como control. Cada solución de ambos sistemas fue coagulada con trombina (0,05 U/ml) y cloruro de calcio (33 mM) dentro de soportes inertes. En los geles de fibrina obtenidos se realizaron mediciones de flujo de solvente eluido vs presión (eluyente: SF) y se calcularon los coeficientes de permeabilidad intrínseca (Ks) correspondientes (n = 15). En todos los casos los Ks, expresados como media ± desvío estándar, resultaron significativamente inferiores al control correspondiente (p < 0,001).

Sistema A	Ks (cm ²)	Sistema B		
		Ks-Control (cm ²)	Ks-Hcy (cm ²)	
Control	(11,52 ± 0,48) × 10 ⁻⁹	(Fg + FXIII) inc	(3,93 ± 0,37) × 10 ⁻⁹	(1,41 ± 0,15) × 10 ⁻⁹
Hcy 50 µM	(10,65 ± 0,58) × 10 ⁻⁹	Fg + FXIII inc	(3,31 ± 0,31) × 10 ⁻⁹	(1,47 ± 0,17) × 10 ⁻⁹
Hcy 250 µM	(8,75 ± 0,58) × 10 ⁻⁹	Fg inc + FXIII	(11,40 ± 0,37) × 10 ⁻⁹	(7,07 ± 0,27) × 10 ⁻⁹
Hcy 500 µM	(5,41 ± 0,41) × 10 ⁻⁹			

La Hcy disminuyó la permeabilidad de geles de fibrina plasmáticos en forma dosis dependiente. Los geles obtenidos a partir de las sustancias purificadas (Fg y FXIII) incubadas con Hcy también mostraron permeabilidad disminuida respecto al control. Este hecho dificultaría la difusión de componentes fibrinolíticos, prolongando la permanencia del coágulo estabilizado.

667. (7804) MEDICIÓN DEL VOLUMEN DE SANGRE CIRCULANTE EN CONEJOS, POR MARCACIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS CON MARCADORES DE SPIN. COMPARACIÓN CON CR(51). FACORRO, GRACIELA; BIANCHIN, ANA; BOCCIO, JOSÉ; HAGER, ALFREDO

Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Existe una historia muy extensa de esfuerzos por medir en forma confiable el volumen de sangre circulante (VSC). Por esta razón se han desarrollado métodos de dilución los cuales utilizan distintos marcadores, tales como monóxido de carbono, colorantes e isótopos radiactivos, pero hasta la fecha el uso de ninguno de ellos ha sido masivo y rutinariamente aceptado en el diagnóstico clínico a pesar de existir poca controversia acerca de la necesidad de su determinación. El objetivo de este trabajo es validar un modelo desarrollado en conejo para la determinación del VSC, realizando una marcación de glóbulos rojos en condiciones de esterilidad con marcadores de spin, detectables por espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica. Los marcadores de spin más comúnmente usados en medios biológicos son los radicales nitróxidos; en este modelo se trabajó con el radical iodoacetamida-Tempo, el cual es permeable a la membrana del eritrocito y se une covalentemente a grupos -SH. La señal plasmática del marcador fue eliminada por el agregado de un apantallador, sal metálica no permeable a la membrana, la cual produce por interacción espín-espín un ensanchamiento de la señal, haciéndola no detectable. El VSC fue medido simultáneamente por marcación de los glóbulos rojos con marcadores de espín y con Cr(51), este último método es actualmente considerado el método de elección. La media de las diferencias entre los VSC obtenidos por ambos métodos fue 2 ml (DS = 7 ml) ó 1% (DS = 5%). Nuestros resultados indican que el método desarrollado es una buena alternativa al método considerado hasta la fecha como método de elección. Desarrollar un modelo equivalente al radioisotópico, que pueda ser aplicado en niños y embarazadas constituye una propuesta innovadora de gran aplicación en clínica y en estudios de biodisponibilidad de fármacos o nutrientes.

668. (7985) EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS DEL DRVVT COMO LUPUS RATIO (LR) Y PORCENTAJE DE CORRECCIÓN (CR) EN LA DETECCIÓN DE INHIBIDOR LÚPICO (IL). GENNARI, LAURA C; BLANCO, ALICIA; GROSSO, SILVIA; DOMINGUEZ, MARIA DE LA PAZ; LAZZARI, MARIA A

Departamento de Hemostasia y Trombosis, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Introducción: La detección del inhibidor lúpico (IL) suele ser difícil no solo debido a la heterogeneidad de los anticuerpos, sino también debido a los fosfolípidos (FL) presentes en los reactivos empleados y al modo de expresión de los resultados. La expresión conocida como "Lupus Ratio" (LR) para la prueba de APTT se basa en los resultados de la mezcla 1:1 (PN) de plasma del paciente (P) y el pool de plasma normal (N), en diferentes concentraciones de FL. Ha sido considerada como una prueba global que incluye el screening, la corrección y la neutralización (confirmatoria). Este sistema integrado sería rápido y además

umentaría la especificidad (E) y sensibilidad (S) en comparación con el uso separado de las pruebas de screening y confirmatorias. Objetivo: Nos propusimos analizar si los resultados del dRVVT expresados como LR ($LR=(PNFLdil/PNFLcc)/(NFLdil/NFLcc)$) mejoran la E y S para la detección del IL en comparación con los resultados expresados como screening prolongado ($P/N>1,12$), no corregido por normal y neutralizado por FL ($\Delta dRVVT=(P/N)FLdil-(P/N)FLcc=0,10$). Además, expresamos los resultados de las pruebas confirmatorias como el cociente $R=(PFLdil/PFLcc)/(NFLdil/NFLcc)$ o como el porcentaje de corrección $CR=((PFLdil/NFLdil)-(PFLcc/NFLcc))/(PFLdil/NFLdil) \times 100$. Materiales y métodos: Se analizaron, mediante la prueba de dRVVT (Sigma), 160 controles para definir el valor de corte para cada una de las expresiones, además de 54 muestras IL+. Resultados: La S y E fue semejante para cada uno de los modos de expresión analizados: LR (76%/84%), R (81%/85%) y CR (89%/79%); con una exactitud de 82%, 84% y 81% respectivamente. Conclusiones: De acuerdo a lo observado, el LR sería equivalente a expresar los resultados según las recomendaciones del SSC-ISTH; ello sugiere que la detección del IL es tal vez más dependiente de los reactivos (FL) empleados que del modo de expresión de los resultados.

669. (7997) ESTUDIO DEL FACTOR VON WILLEBRAND (VWF) Y LA ADAMTS13 EN DOS CEPAS DE RATONES: BALB/C Y C57BL/6J. UN MODELO ANIMAL POSIBLE DE MICROANGIOPATÍA TROMBÓTICA. SÁNCHEZ-LUCEROS, ANALÍA; KEMPFER, ANA C; PIAZZÓN, ISABEL; FARÍAS, CRISTINA; AMARAL, MARÍA M; NEPOMNASCHY, IRENE; LAZZARI, MARÍA A

IHEMA, Academia Nacional de Medicina, CONICET

En un estudio preliminar, 75% de ratones endocriados BALB/c mostraron aumento de múltímeros extragrandes del VWF (ULVWF) circulantes. El objetivo del presente trabajo fue confirmar los datos iniciales. En base a los resultados en mujeres normales (Sánchez-Luceros y col., 2004, en prensa), estudiamos ratones hembra múltiparas para evaluar la influencia del embarazo sobre el VWF. Además, estudiamos ratones C57BL/6J para evaluar la relación con la cepa o con la especie. Material y método: Evaluamos 51 ratones BALB/c (41 hembras, 10 machos) y 33 C57BL/6J (21 hembras, 12 machos): 44 hembras vírgenes/17 múltiparas. Una hembra fue evaluada intraembarazo. Se evaluaron (con anticuerpos anti-humanos): VWF:Ag (ELISA), el patrón multimérico (densitometría) y el efecto de ADAMTS13 sobre VWF purificado humano (VWF:CB). Resultados: En la tabla se muestran los resultados (BALB/c: A y C57BL/6J: B). No hubo diferencias por sexo ni paridad. La media de ADAMTS13 fue inferior ($p=0,07$) en la cepa C57BL/6J. 87% de los ratones presentaron un aumento de ULVWF circulantes. La hembra preñada no mostró diferencias con respecto a la población (VWF:Ag:15%, ADAMTS13 46%)

	N muestras	A:media±DE	N muestras	A:media±DE
VWF:Ag	37	16±9	18	13±9
ADAMTS13	36	36±15	18	29±10
ULVWF	16	32±12	8	35±10

Los resultados confirman un aumento de ULVWF circulantes en ratones y sugieren que ésta es una característica de la especie murina. A diferencia del humano, la paridad no influyó los niveles de VWF ni de ADAMTS13. El modelo murino surge como un modelo posible para estudiar los mecanismos que regulan la proteólisis del VWF y la trombogenicidad de los ULVWF.

670. (8010) NIVELES DE ARNM DE PDGF-A Y PDGF-B EN PACIENTES CON TROMBOCITEMIA ESENCIAL TRATADOS CON ANAGRELIDE. SALIM, JUAN PABLO; LEV, PAOLA R.; HELLER, PAULA G.; KORNBLIHTT, LAURA; PIROLA, CARLOS J.; MOLINAS, FELISA C.

IDIM-A. Lanari-Hematología Investigación

La trombocitemia esencial (TE) se caracteriza por trombocitosis y un incremento de megacariocitos en médula ósea. La plaqueta almacena PDGF en sus gránulos-alfa que se libera durante su activación. Previamente encontramos el PDGF-AB disminuido en las plaquetas de los pacientes con TE que se normaliza por el tratamiento (tto) con anagrelide y para determinar si esta disminución se debía a liberación plaquetaria o a disminución de su síntesis, se midió el ARNm de la cadena A del PDGF intraplaquetario (ip) en dos grupos diferentes de pacientes con TE: sin tto y tratados con anagrelide, hallándose disminuido en ambos grupos. En este trabajo nos propusimos evaluar los niveles de ARNm de PDGF-A y PDGF-B en el mismo grupo de pacientes antes y durante el tto. Se midió en 9 casos el ARNm ip. por RT-PCR semicuantitativa, co-amplificando el ARNm del GAPDH como control interno y calculando la relación de PDGF/GAPDH por densitometría de geles de agarosa. Observamos una disminución en los valores del ARNm del PDGF-A similar a lo hallado previamente, rel PDGF-A/GAPDH: 0.28 (mediana) en los pacientes sin tto y 0.59 en los controles p: 0.013; rel: 0.37 en los pacientes tratados, p: 0.009. También los niveles del ARNm PDGF-B se encontraron disminuidos en los pacientes sin tto, rel PDGF-B/GAPDH: 0.35 y 0.88 en los controles, p: 0.009. Esta relación se incrementa durante el tto, rel:1.33, p:0.044, superando los valores del grupo control. Los bajos niveles del ARNm del PDGF-A y B en los pacientes sin tto podrían explicar la disminución del PDGF-AB ip., sin embargo no puede descartarse la liberación del contenido de los gránulos-alfa secundaria a activación plaquetaria. Las implicancias del incremento del ARNm del PDGF-B durante el tto no se conocen, sin embargo no hallamos diferencias clínicas ni histológicas en la médula ósea de los pacientes con mayores niveles del ARNm de esta citoquina comparados con el resto de los pacientes del grupo.

HEMATOLOGÍA 3: TERAPÉUTICA

671. (6613) INCAPACIDAD DE ERITROPOYETINA PARA INDUCIR ESTADO HIPERSECRETORIO DE ERITROPOYETINA. CONTI, MARIA INES; LEZON, CHRISTIAN; MARTINEZ, MARIA P.; BOZZINI, CARLOS

Cátedra de Fisiología Facultad de Odontología, Bio Sidus S.A.

El «estado hipersecretorio de eritropoyetina» (EPO-HS) puede ser definido como aquella condición, producto de ciertos tratamientos experimentales, que se observa en animales con policitemia post-transfusional en los que la secreción estimulada de EPO es independiente del grado de policitemia presente en los mismos, siendo varias veces superior a la observada en animales policitémicos controles no tratados previamente y con un mismo grado de policitemia. Los inductores de EPO-HS han sido clasificados en «hipóxicos» y «no hipóxicos». El proyecto de investigación presente tuvo como objetivo determinar si rHu-EPO puede ser considerada como un inductor no hipóxico de EPO-HS. Ratones CF#1 hembras adultos recibieron 10 UI de rHu-EPO (Bio Sidus S.A.) por vía sc durante 5 días consecutivos. Fueron transfundidos por vía ip 72 h después de la última administración de rHu-EPO con 1,2 ml de eritrocitos heterólogos centrifugados y lavados. Fueron expuestos a hipoxia hipobárica (506 mbar) durante 6 h, 24 h después de efectuada la transfusión. La concentración de EPO en plasma fue determinada mediante inmunoensayo (ELISA, Medac Diagnostika, FRG). Fueron estudiados 3 grupos experimentales y 3 controles, de acuerdo a que fueran hipertransfundidos, expuestos a hipoxia o tratados con rHu-EPO. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y test de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls. La respuesta hipersecretora de EPO a hipoxia sólo fue observada en el grupo normocitémico ($98,4 \pm 15,4$ mU/ml) siendo suprimida por el estado policitémico, tanto en animales tratados ($7,33 \pm 5,2$ mU/ml) como no tratados con rHu-EPO ($8,2 \pm 2,3$ mu/ML). rHu-EPO no puede ser considerada como un inductor no hipóxico de estado hipersecretorio de EPO en las condiciones experimentales presentes.

672. (6632) TESTOSTERONA COMO INDUCTOR NO HIPÓXICO DE ESTADO HIPERSECRETORIO DE ERITROPOYETINA EN RATÓN ORQUIDECTOMIZADO. MARTÍNEZ, MARIA DEL PILAR; BARCELO, ANA C.; CONTI, MARÍA I.; ALIPPI, ROSA M.; BOZZINI, CARLOS E.

Catedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, BIO SIDUS S.A.

El «estado hipersecretorio de eritropoyetina» (EPO-HS) es una condición, producto de ciertos tratamientos, que se observa en animales con policitemia post-transfusional en los que la secreción estimulada de EPO es superior a la observada en animales policitémicos no tratados. El propionato de testosterona (PT) es un inductor no hipóxico de EPO-HS. El objetivo del presente proyecto fue establecer una relación dosis-respuesta para el esteroide y correlacionar su actividad inductora con sus acciones androgénica y renotrófica. Ratonos CF#1 machos fueron castrados a los 30 d de edad. Dos meses más tarde, grupos de n = 10 recibieron TP por vía sc en dosis de 50, 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 µg, 3 x sem x 4 sem. Como controles, se utilizaron ratones enteros o castrados inyectados con el vehículo. Recibieron una transfusión heteróloga de 1,2 ml por vía ip 4 d después del tratamiento, siendo expuestos durante 6 h a una presión de 506 mbar para estimular la secreción de EPO 24 h más tarde. La concentración de EPO en plasma (pEPO) fue determinada mediante inmunoensayo. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante ANOVA y post-test. La castración indujo descenso significativo del peso de vesículas seminales (VS) y de riñones (R). Todas las dosis de PT empleadas incrementaron el peso de VS en los ratones castrados; dosis > 100 µg normalizaron ese peso, observándose un patrón similar en relación con el peso de R. La concentración de pEPO en respuesta a hipoxia aumentó en los ratones policitémicos en relación directa con la dosis de PT administrada (control: 15,9 ± 3,0 mU/ml; 200 µg = 89,9 µg ± 18,5-umbral; 3200 µg = 142,3 ± 24,2-máxima). Correlación: a) entre pEPO y VS, r = 0,96; b) entre pEPO y R = 0,91. PT induce EPO-HS a partir de la dosis de 200 µg en las condiciones experimentales descriptas. Esa acción está asociada a los efectos androgénico y renotrófico del esteroide.

673. (6648) CORRELACION ENTRE ACTIVIDAD RENOTRÓFICA, ANDROGENICA O ANABOLICA DE ESTEROIDES Y CAPACIDAD INDUCTORA DE ESTADO HIPERSECRETORIO DE ERITROPOYETINA BARCELO, ANA C.; CONTI, MARIA I.; MARTINEZ, MARIA P.; ALIPPI, ROSA M.; BOZZINI, CARLOS E.

Catedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, BIO SIDUS S.A.

Existe «estado hipersecretorio de eritropoyetina» (EPO-HS) cuando la policitemia post-transfusional no inhibe la secreción hipóxica de EPO. Los «inductores», de EPO-HS pueden ser «hipóxicos» o «no hipóxicos». Entre los últimos, existen esteroides con distinta actividad renotrófica (peso renal), androgénica (peso de vesícula seminal) o anabólica (peso del elevador del ano). Nuestro objetivo fue correlacionar esas actividades con la capacidad inductora de EPO-HS de esteroides con distinta relación androgénica/anabólica: testosterona, nandrolona (19-nortestosterona) y oximetolona. Ratonos CF#1 machos fueron castrados a los 30 d de edad, siendo separados en grupos de n = 10 e inyectados por vía sc con 0, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 o 3200 µg 3/sem x 4 sem 60 d más tarde; 4 d post-tratamiento, recibieron una inyección ip de 1,2 ml de suspensión de eritrocitos heterólogos, siendo expuestos a aire mantenido a 506 mbar en una cámara hipobárica durante 6 h, 24 h más tarde. La concentración de EPO en plasma (pEPO), medida mediante inmunoensayo, fue considerada como índice de secreción hormonal. Los resultados se muestran en la tabla, que muestra la correlación (r) entre pEPO y las tres actividades esteroideas citadas (*P>0.05). Ratas S-D hembras fueron hipofisectomizadas (30d) e inyectadas sc con 5mg de propionato de testosterona, 3/sem x 6 sem, siendo transfundidas (2 ml) y expuestas a

hipobaría según descripto. Se observó EPO-HS sin acción renotrófica del esteroide.

Actividad	Renotrófica	Androgénica	Anabólica
Testosterona	0,9084	0,9629	0,8854
Nandrolona	0,8995	0,9213	0,6851*
Oximetolona	-0,0794*	-0,0814*	-0,0729*

La inducción de EPO-HS estaría ligada a la acción androgénica de los esteroides.

674. (7322) EFECTO IN VITRO DEL METROTEXATO SOBRE LA REOLOGIA ERITROCITARIA. GEORGETTI, MARÍA EDITH (1); URLI, LEDA (1); SVETAZ, MARÍA JOSÉ (2); VOLPINTESTA, RICARDO (1); LUQUITA, ALEJANDRA (1); RASIA, MARTA (1)

(1) *Cátedra Biofísica Fac.Ciencias Médicas, (2) Fac.Cs.Bioq y Farm UNR.*

El metotrexato (Mtx) es un antimetabolito usado en el tratamiento de la artritis reumatoidea hasta concentraciones séricas máximas de 0,1 a 2 microMolar. Entre las reacciones adversas encontradas produce anemia, por lo que nos propusimos estudiar el efecto del Mtx sobre la reología eritrocitaria in vitro. Cada muestra de sangre normal se fraccionó en cinco partes, una se usó como control (C) y a las restantes se le agregó concentraciones crecientes de Mtx (0,5; 0,75; 1,0 y 5 µM) (n=5). Las alícuotas se incubaron 120 minutos a 37 °C y se determinó en ellas: I) la forma celular por microscopía directa (Índice Morfológico de Bessis (IM = $\frac{\text{á}}{\text{índice de forma} \times \text{n}^\circ \text{ de células}} \times \text{n}^\circ \text{ total de células}$) y II) el índice de rigidez (IR), por filtración a través de membrana nucleopore; III) Hematocrito; IV) conteo de glóbulos rojos; V) concentración de hemoglobina (Hb). Los resultados se expresan como media y error estándar (x ± ES) y se analizaron por la t de Student para datos apareados: Índice de rigidez: C: 7,37 ± 0,78; Mtx 0,5: 7,65 ± 0,90; Mtx 0,75: 89,7 ± 1,02 **; Mtx 1: 11,50 ± 1,01 *; Mtx 5: 6,25 ± 0,67**. Índice Morfológico IM:C: -0,03 ± 0,03; Mtx 0,5: -0,016 ± 0,148; Mtx 0,75: -0,127 ± 0,093; Mtx 1: -0,134 ± 0,043; Mtx 5: -0,337 ± 0,099*. Volumen Corpuscular Medio (VCM en m3): C: 90,52 ± 0,5; Mtx0,5: 89,70 ± 0,35; Mtx0,75: 89,68 ± 0,35; Mtx1: 89,48 ± 0,37 *; Mtx 5: 88,22 ± 0,93. (*p<0,05; **p<0,01 respecto de C). La CHbCM no se modificó (p>0,01). La respuesta observada fue particular a 5µM. La presencia de Mtx en el medio (suero autólogo) -en las dosis utilizadas para el tratamiento de artritis reumatoidea (0,75 a 1 µM)- disminuyó la deformabilidad eritrocitaria (mayor IR). A dosis mayores altera la curvatura de la membrana (estomatocitosis) y disminuye el volumen corpuscular medio de los eritrocitos. Estas modificaciones podrían ser factores coadyuvantes de la anemia encontrada en los pacientes tratados con dicho fármaco.

675. (7488) ESTUDIO DE PARÁMETROS HEMORREOLÓGICOS EN RATAS TRATADAS CON PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE LIGARIA CUNEIFOLIA. DOMINIGHINI, ALICIA; FERRERO, M; CROSETTI, D; ALVAREZ, ML; RONCO, MT; WAGNER, M; GURNI, A; CARNOVALE, CRISTINA E; LUQUITA, ALEJANDRA

Biofísica- Cs. Médicas, Fisiología, Cs. Bioquím y Farm-UNR-CONICET. Farmacobotánica, Farmacia y Bioquímica-UBA

En estudios previos se observó que el extracto completo de *Ligaria cuneifolia* (Lc) administrado por vía i.p. se asoció a modificaciones en la fluidez de la sangre: disminución de la deformabilidad eritrocitaria y aumento de la viscosidad sanguínea. Objetivo: analizar el efecto del tratamiento con proantocianidinas de distinto peso molecular extraídas de Lc (PLc) sobre la deformabilidad y forma eritrocitaria. Ratas Wistar machos adultos fueron inyectadas cada 24 horas durante 3 días con Solución Fisiológica i.p. (Controles(C); n=6) o con PLc 0,60

mg/100g PC i.p. (Tratadas (T); n=5). El cuarto día las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg /kg PC, i.p.) obteniéndose sangre por punción cardíaca. Se determinaron: deformabilidad eritrocitaria (IR: inversa de la deformabilidad eritrocitaria) por el método de filtración por membranas de microporos; hematocrito por micrométodo; conteo de glóbulos rojos en cámara cuenta glóbulos; volumen corpuscular medio (VCM) por cálculo y forma eritrocitaria por microscopía directa utilizando la clasificación de Bessis (Discocito: 0, Estomatocito I: -1, Estomatocito II: -2, Estomatocito III: -3, Esferoestomatocito: -4), calculándose el Índice Morfológico (IM) con la fórmula: Sumatoria [índice de forma x número de células / número total cél.]. Resultados: (x media ± ES). IR: C: 8,47 ± 1,12, T: 28,65 ± 4,28*; VCM (µl): C: 59,25 ± 2,98; T: 67,84 ± 2,33*; IM: C: -0,751 ± 0,097, T: -1,567 ± 0,150*; (*p<0,05 vs. C). El tratamiento con PLC (dosis 0.60 mg%) produce un cambio de curvatura en la membrana del glóbulo rojo con el consecuente incremento significativo de Estomatocitos III, los cuales se caracterizan por presentar menor deformabilidad. La disminución de la deformabilidad observada (aumento de IR) también sería consecuencia del incremento del tiempo de filtración por alteración del volumen globular (aumento de VCM) y de la relación superficie / volumen eritrocitaria.

676. (7662) MUTACIONES EN EL SITIO DE UNIÓN DEL ATP DEL GEN BCR-ABL EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA TRATADOS CON STI571. GARGALLO, PATRICIA (1); BELLI, CAROLINA (1); ROSSETTI, LILIANA (1); CUELLO, MARIA TERESA (1); BENGIÓ, RAQUEL (1); MOIRAGHI, BEATRÍZ (2); LARRIPA, IRENE (2)

(1) Depto Genética, IHema, Academia Nac.de Medicina, (2) Htal. Ramos Mejía. Buenos Aires, Argentina.

El tratamiento de los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) ha mejorado profundamente con el uso de la droga STI571 (Gleevec/Imatinib myslate), la cual inhibe la actividad de tirosina quinasa de la proteína ABL. Sin embargo, una proporción de pacientes, particularmente aquellos en etapas avanzadas de la enfermedad adquieren resistencia clínica a pesar de responder inicialmente al tratamiento. La resistencia al STI571 se ha asociado a mutaciones puntuales en el dominio ABL quinasa del gen BCR-ABL. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la presencia de mutaciones en un grupo de 16 pacientes con LMC tratados con STI571 y correlacionar su presencia con la respuesta hematológica, citogenética y molecular. Estudiamos 18 ADN de los cuales amplificamos por PCR el exón 4 del gen ABL y los analizamos por SSCP (Single-strand conformation polymorphism analysis). Identificamos 2 pacientes con patrones alterados (2/16), los cuales fueron confirmados por secuenciamiento directo. Un paciente presentó una mutación en el nucleótido 1127 (1127G>A) resultando en la sustitución en el codón 255 del aminoácido ácido glutámico por lisina, ya publicada previamente. El otro paciente mostró una nueva mutación, no descrita hasta la fecha, en la posición 1104 (1104A>G), codón 247 resultando en la sustitución de lisina por arginina. Al momento del estudio ambos pacientes no lograron respuesta hematológica ni citogenética. Concluimos que la adquisición de mutaciones puntuales en el sitio de unión del ATP en el dominio ABL quinasa puede ser un mecanismo involucrado en generar resistencia clínica al STI571.

677. (7853) EFECTOS DEL ACIDO 5-AMINO LEVULINICO (ALA) SOBRE EL GR. ANÁLISIS MEDIANTE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (EPR). MARTÍNEZ SARRASAGUE, MARÍA MARGARITA; TORTI, HORACIO; HUARTE, MÓNICA; GAMBOA ARAGÓN, ADELAIDA; PIÑEIRO, ADRIANA; HAGER, ALFREDO; CIMATO, ALEJANDRA

Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

El ALA, que se acumula en la porfiria aguda intermitente (PAI) y el saturnismo, sufre un proceso oxidativo generando radicales libres muy reactivos. El objetivo del trabajo es evaluar, empleando indicadores de stress oxidativo y parámetros reológicos sanguíneos, los efectos de elevadas concentraciones de ALA sobre el GR. Sangre de individuos sanos fue incubada 4 hs a 37°C sin y con ALA (60 µM). Los indicadores de stress: peroxidación basal, resistencia al stress y capacidad antioxidante del plasma (CAOP) fueron estimados con la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS). La microviscosidad interna, un fuerte indicador del medio interno del GR, y la fluidez de membrana se analizaron por EPR. Idénticas determinaciones se realizaron a las muestras con plomo. En las muestras incubadas con ALA y en las de pacientes con saturnismo, el ALA elevado provocó un incremento relativo en la oxidación basal de los GR (de 8 a 120%), una respuesta aumentada al stress oxidativo inducido y una disminución de la CAOP (33 nmoles/ml AA vs 60 nmoles/ml AA). Además se observó una disminución del parámetro de orden S en la membrana del GR (0,6769 vs 0,7152). En las muestras incubadas con ALA no se registraron alteraciones en la microviscosidad interna del eritrocito, pero en las de pacientes con saturnismo se observó una disminución de la misma (3,32.10(-10)s vs 3,78.10(-10)s). Los resultados indican que el ALA plasmático elevado provoca daño directo sobre los GR, altera la susceptibilidad a la oxidación y aumenta la fluidez de membrana. Estudios preliminares en muestras de pacientes intoxicados con plomo arrojan resultados similares. La exposición crónica a elevadas concentraciones de ALA sería responsable de la disminución de la microviscosidad interna del GR. Futuras investigaciones de pacientes con PAI y saturnismo serán necesarias para comprobar los daños crónicos causados por altas concentraciones de ALA en plasma.

678. (7999) RESPUESTA FIBRINOLÍTICA AL DDAVP EN PACIENTES CON PROBABLE VWD TIPO 1 CON Y SIN HEMORRAGIA MAYOR EN CIRUGÍAS. WOODS, ADRIANA INÉS; BLANCO, ALICIA N; NADAL, MARIA V; MESCHENGIESER, SUSANA S; GROSSO, SILVIA H; LAZZARI, MARÍA A

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

Nos propusimos verificar si la estimulación del sistema fibrinolítico in vivo puede influir en la incidencia de hemorragias mayores en pacientes (pts) con enfermedad de von Willebrand (VWD) probable tipo 1. Para ello, evaluamos los datos de la fibrinólisis (tiempo de lisis de euglobulinas TLE) en pacientes con niveles de VWF/FVIII y respuesta adecuada al DDAVP comparables, sin (grupo A: 70 pacientes, VWF:Ag: 41,6±11,3 U/dL; FVIII: 41,5±12,6 U/dL; VWF:RCo: 38±6,1 U/dL) y con (B: 27 pacientes, VWF:Ag: 42,1±10,3 U/dL; FVIII: 51,3±20,6 U/dL; VWF:RCo: 36,4±7,7 U/dL) antecedentes de hemorragia mayor en cirugías previas al diagnóstico. Métodos: Se comparó el TLE pre y post DDAVP. Tests estadísticos usados: t-test y chi2. Resultados: Grupo A: TLE pre DDAVP: 188,9 ± 68,1 min; pts con <90 min: 4%; con >240 min: 28,4%; TLE post DDAVP: 66,3 ± 38,1min; pts con <25 min: 8,6%; de 25-49 min: 24,3%; de 50-89 min: 44,3%; 90-240 min: 21,4%; >240 min: 1,4%. TLE pre-post: 117,6 ± 63,5 min; pts con <50 min: 11,4%; de 50-120 min: 31,4%; >120 min: 57,2%. Grupo B: TLE pre DDAVP: 174,6 ± 52,1 min; pts con <90 min: 0%; con >240 min: 20%; TLE post DDAVP: 63,2 ± 39,1min; pts con <25 min: 12%; de 25-49 min: 32%; de 50-89 min: 40%; 90-240 min: 16%; >240 min: 0%. TLE pre-post: 114,4 ± 45,8 min; pts con <50 min: 8%; de 50-120 min: 44%; >120 min: 48%. En pacientes con VWD probable tipo 1 no se encontraron diferencias en los TLE de aquellos con hemorragias mayores postquirúrgicas y los que no sangraron, aún utilizando el DDAVP como factor estimulante de la fibrinólisis. Si la respuesta al DDAVP reflejase un real aumento de la actividad fibrinolítica in vivo, ésto no parece tener relación con las hemorragias mayores observadas en los pacientes seleccionados.

679. (8059) EVALUACIÓN DE PLAQUETAS RETICULADAS EN PACIENTES CON TROMBOCITEMIA ESENCIAL. GLEMBOTSKY, ANA; MARTA, ROSANA; MONSERRAT, MERCEDES; GOETTE, NORA; MOLINAS, FELISA

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari

El hallazgo de alteraciones en el volumen plaquetario es un hecho constante en la trombocitemia esencial (TE), desorden mieloproliferativo crónico caracterizado por aumento del recuento plaquetario en sangre periférica y de megacariocitos en médula ósea. En un estudio previo demostramos que los pacientes presentan volumen plaquetario medio (VPM) disminuido que aumenta con el tratamiento con anagrelide (ANA). No obstante, en ambos grupos de pacientes se observa una gran heterogeneidad en el volumen de la población plaquetaria. Dado que las plaquetas de producción reciente contienen una cantidad residual de RNA, pueden ser detectadas por marcación con un colorante que se une selectivamente al mismo como el naranja de tiazol (TO). El objetivo de este trabajo fue evaluar el nivel de plaquetas reticuladas (PR) y relacionarlo con el VPM en pacientes con TE. Estudiamos un grupo de 8 pacientes con TE en tratamiento con ANA y 8 controles normales. El plasma rico en plaquetas se incubó con 50 pg/ml de TO durante 1 hora y se analizaron las muestras por citometría de flujo (Becton Dickinson). La población se seleccionó por la marcación de la G1b (CD42b) y se obtuvieron el porcentaje de positividad y la relación de intensidad de fluorescencia media (RFI) (Gmean TO/Gmean PBS). Los pacientes con TE en tratamiento con ANA presentaron un aumento del VPM 9.65 fL (8.6-10.5) (mediana y rango) así como de la RFI, 1.76 (0.68-12.6), comparados con la población normal, VPM 7.5 fL (6.6-9.7), RFI 1.44 (1.10-1.62), $p=0.0038$ y $p=0.04$, respectivamente. No se encontraron diferencias en los porcentajes de marcación ni correlación entre el VPM y RFI. En conclusión, los pacientes con TE en tratamiento con ANA presentan un aumento del contenido plaquetario de RNA que no parecería estar relacionado al volumen de las plaquetas.

INMUNOLOGÍA 10: INMUNODEFICIENCIAS

680. (6785) AGAMMAGLOBULINEMIA AUTOSÓMICA RECESIVA: PRESENTACIÓN DE UN CASO. CANTISANO, CLAUDIO; QUIROZ, HÉCTOR; BALBARYSKI, JEANETTE; GADDI, EDUARDO; CANDI, MARCELA; BARBONI, GRACIELA; GIRAUDI, VERA

Hospital Pedro de Elizalde

La agammaglobulinemia ligada al X es la enfermedad característica de la deficiencia de anticuerpos, se presenta con hipogammaglobulinemia congénita y alteración en el proceso de diferenciación normal de las células B que lleva a ausencia o reducción en el número de las mismas. Sin embargo un porcentaje pequeño de pacientes con estas características son mujeres. Se presenta el caso de una paciente de sexo femenino de 1 año y 8 meses, con broncoespasmos y otitis media a repetición, síndrome febril periódico sin foco y onicomiosis desde los 3 meses de edad. No se visualiza tejido amigdalino ni ganglios palpables al examen físico. Imágenes radiológicas compatibles con bronquiectasias basales. Inmunoglobulinas séricas: IgA:2,3 mg/dl, IgM:20 mg/dl, IgG: 35,8 mg/dl. Inmunidad celular: CD3+:92% (6388/mm³), CD4+:74% (4736/mm³), CD8+:16% (1024/mm³), CD19+:0%. Isohemaglutininas: negativas, grupo 0 factor Rh(+). Respuesta alterada frente a antígenos polisacáridos y proteicos con respuesta proliferativa normal a mitógenos y antígenos. Resultados de la inmunomarcación medular sobre el gate linfóide: CD45+:73%, CD19+:16%, CD34+/CD19+:14%, CD10+:12%, CD10+ /HLA-DR+:12%, HLA-DR+:62%, CD22+:16%, CD19+/CD5+:1%. CD2+:42%, CD7+:37%, CD3+:34%, CD79a+(c): 0,06%, cad. μ (c): negativa, Igs superficie:negativas. Estudio citogenético: cariotipo femenino normal. El estudio de los genes mutados, hasta ahora conocidos, implicados en la agammaglobulinemia autosómica recesiva, cadena μ , BLNK, Ig alfa, lambda 5 y LRRC8,

fueron normales. El alto porcentaje de precursores medulares B que expresan CD34, CD19, CD10, CD22, HLA-DR, la ausencia de cadena μ (c) y de Igs de superficie, asociados a la ausencia periférica de células B CD19+ sugieren un freno madurativo anterior al estadio pre B. La falta de expresión de la molécula CD79a explica el bloqueo madurativo descripto. La normalidad del estudio molecular sugeriría la existencia de otros genes, todavía no descriptos, probablemente relacionados con esta patología.

681. (7022) QUEMOQUINA CCL25 (TECK) EN MUCOSA INTES-TINAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INMUNODEFICIENCIA SECUNDARIA. MONTERO, VANESA; SOSA, GUSTAVO ADOLFO; ROUX, MARÍA ESTELA

Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA, Lab. de Inmunología Celular, Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Trabajos previos publicados demostraron alteraciones permanentes en timo, en tejido linfóide asociado a intestino y en vellosidad intestinal en un modelo de inmunodeficiencia por déficit proteico severo al destete (malnutrición proteica). Se observó en este modelo un número aumentado de células T gd+ en lámina propia, y en intraepitelio aumento de linfocitos intraepiteliales intestinales (LIEi) T gd+CD8aa+CD25+. Los objetivos del presente trabajo fueron determinar si en este modelo experimental la quemoquina TECK está: 1) alterada luego de la renutrición con caseína al 20% durante 21 días y si 2) las subpoblaciones T de LIEi CD8a+ y TCRgd+ eran TECK positivas, indicando así la importancia de esta quemoquina en la atracción y en la generación de estas subpoblaciones. Se utilizaron ratas Wistar que sufrieron privación proteica severa al destete hasta perder el 25 % del peso inicial, y que luego recibieron dieta de caseína al 20 % durante 21 días (R21) y ratas controles de igual edad alimentadas con dieta comercial (C). Sobre cortes de intestino de 5 μ m se estudió por inmunofluorescencia indirecta (IFI): a) el número de vellosidades (membrana basolateral epitelial) y de criptas TECK+; b) por IFI doble, las células TCRgd+TECK+ y las CD8a+TECK+. Resultados (X \pm ES, C vs R21, n=4, test de Student): Epitelio TECK+: 33.5 \pm 4.7 vs 47.2 \pm 3.5, $p=NS$; Criptas TECK+: 55.5 \pm 4.2 vs 40.2 \pm 5.4, $p=0.02$; LIEi TCRgd+: 13.5 \pm 5.3 vs 25.5 \pm 3.7, $p=0.01$; LIEi TECK+: 9.5 \pm 1.7 vs 13.5 \pm 1.3, $p=0.04$; LIEi CD8a+: 13.3 \pm 1.4 vs 27.0 \pm 1.2, $p=0.0003$; LIEi TECK+: 9.3 \pm 1.1 vs 32.3 \pm 1.3, $p=0.0001$. Conclusiones: 1) no se observan diferencias significativas en la expresión de TECK en epitelio de vellosidad pero si en el número de criptas con epitelio TECK+; 2) los LIEi CD8a+ en su mayoría son TECK+; 3) los LIEi TCRgd+ son TECK+ sólo en un 45%. Nuestros resultados parecerían indicar que TECK intervendría en la atracción y generación de los LIEi CD8a+ mientras que la mayoría de los LIEi gd+, aumentados en este modelo, son generados in situ. UBA B010 y PIP02855.

682. (7673) HIPOPLASIA CARTÍLAGO PELO: MANIFESTACIONES CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS. ORNANI, ALICIA; FANO, VIRGINIA; BARREIRO, CRISTINA; ROSSI, JORGE; ROY, ADRIANA; DANIELIAN, SILVIA; ROSENZWEIG, SERGIO; ZELAZKO, MARTA; OLEASTRO, MATÍAS.

Hospital Nacional de Pediatría Prof Dr J. P.Garrahan

La Hipoplasia Cartílago Pelo (HCP) es una condrodisplasia metafisaria autosómica recesiva caracterizada por baja talla con miembros cortos y anomalías en el pelo, asociada a compromiso inmunológico variable, principalmente de la inmunidad mediada por células. Mutaciones en el gen RMRP han sido identificadas. Describimos las manifestaciones clínicas e inmunológicas de pacientes con HCP en edad pediátrica. Método: Análisis retrospectivo de datos obtenidos de historias clínicas de 5 pacientes (4 femeninos y 1 masculino) evaluados entre los años 1991 y 2004 en este hospital. Resultados: Todos los pacientes presentaron signos radiológicos característicos; 4 tuvieron anomalías clínicas en el pelo; 1 presentó leucopenia con neutropenia crónica. Sólo en 2 se halló mutación heterocigota en el gen RMRP.

Paciente	Orientación diagnóstica	Edad al diagnóstico	Talla al diagnóstico	Infecciones	Complicaciones	Enfermedad asociada	Aspecto humoral	Aspecto celular	Evolución tratamiento
1	Prenatal fémur corto	1 año	-2.5 DE	OMA supuradas recurrentes Neumonías recurrentes Herpes labial recurrente Verrugas planas	Bronquiectasias Pioderma gangrenoso like	no	Deficiente respuesta a antígenos polisacáridos	Linfopenia T CD3 CD4 CD8 Proliferaciones linfocitarias: mitógenos: normal bajo; antígenos: disminuidas	Vivo (19 años) Gamaglobulina EV TMS
2	Neonatal baja talla	4 años	-6 DE	OMA supuradas recurrentes Neumonías recurrentes Varicela	Bronquiectasias	no	Hipergamaglobulinemia GAM	Linfopenia T CD3 CD4 Proliferaciones linfocitarias: mitógenos: normal bajo; antígenos: no valorado	Vivo (10 años) TMS
3	2 años: infecciones recurrentes 4 años: baja talla	6 años	-2.8 DE	OMA supuradas recurrentes Neumonías recurrentes Varicela	Bronquiectasias	no	Hipergamaglobulinemia GAM	Linfopenia T CD3 CD4 CD8 Proliferaciones linfocitarias: mitógenos y antígenos: disminuidas	Vivo (11 años) TMS
4	Prenatal fémur corto	2 meses	-5.7 DE	Bronquiolitis Muequet	no	Enfermedad de Hirschsprung	Normogamaglobulinemia GAM	Linfopenia T CD3 CD4 CD8 Proliferaciones linfocitarias: mitógenos y antígenos: ausentes	Fallecido (8 meses) TMO
5	Prenatal fémur corto	2 meses	-8 DE	Bronquiolitis Diarrea	no	Enfermedad de Hirschsprung	Normogamaglobulinemia GAM	Linfopenia T CD3 CD4 CD8 Proliferaciones linfocitarias: mitógenos: disminuidos; antígenos: no valorable	Vivo (1 año) TMS

Es posible una orientación diagnóstica precoz aunque ésta puede ser dificultosa en ciertos casos. Destacamos la alta frecuencia de enfermedad broncopulmonar crónica secular tipo bronquiectasias. Observamos un rango amplio de variabilidad en cuanto al compromiso de la inmunidad humoral con compromiso constante de la inmunidad celular.

683. (7825) AGAMAGLOBULINEMIA (AG), LEUCOENCEFALITIS MULTIFOCAL (LEM) POR VIRUS JC Y COMPROMISO CELULAR PROGRESIVO. GAILLARD, MARIA ISABEL; PAZ, RUBEN; SARDAÑONS, JESSICA ; GOMEZ SCHMID, ROBERTO; BEZRODNIK, LILIANA

Inmunología Hospital de Niños R. Gutierrez Bs As. Argentina

La AG es un síndrome caracterizado por deficiencia de inmunoglobulinas y ausencia de linfocitos B maduros (LB). La LEM es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central causada por el virus JC y descrito como complicación progresiva y fatal en individuos con deficiencia celular. Objetivo: presentar un paciente con deficiencia humoral, LEM progresiva y compromiso celular en el tiempo. Paciente de 13 años, varón, hijo único, padres no consanguíneos, sin antecedentes familiares. A los 13 meses se le diagnóstica AG: hipogamaglobulinemia severa, LB: 0%, clínica compatible (neumonía, bronquitis recurrente y adenitis). Estudio molecular no reveló mutación en el gen de Btk. A los 4 años, sin compromiso celular (poblaciones linfocitarias y cultivos celulares normales) presentó un cuadro de encefalopatía subaguda progresiva, diagnosticado por biopsia estereotáxica: LEM por virus JC. Recibe tratamiento con Arabinosa-Citosina e IFN- α , con buena evolución quedando con secuelas cognitivas y neuromotoras. Sin nuevas complicaciones infecciosas hasta la actualidad. Laboratorio actual: * Linfocitos: 3800 /mm³. * Poblaciones celulares: CD3: 89% (3382/mm³), CD4: 53% (2014 /mm³), CD8: 31% (1178 /mm³), CD20: 0%, CD56: 6% (228 /mm³). * Cultivo celular: PHA: 10000 cpm (respuesta ausente), PHA+IL-2: 30000 cpm; PWN: 77000 cpm (normal alto). ConA: 25000 cpm (respuesta baja). OKT3: 14000 cpm (respuesta ausente). OKT3+IL-2: 52000 cpm. Punción aspirado de médula ósea: 0.6% de LB, fenotípicamente compatibles con un arresto madurativo en estadio Pro-B: CD19+, CD34+, Tdt +, CD79acit -, CD79bcit+ CD79bsup-, IgMcit-. Diagnóstico posible: Agamaglobulinemia autosómica recesiva. Conclusión: Las agamaglobulinemias no presentan compromiso celular. Reportamos un

paciente con AG, LEM por virus JC y compromiso celular progresivo. Comentario: ¿Este compromiso celular es secundario a la LEM o podría esta asociación sugerir una nueva inmunodeficiencia?

684. (7862) CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE (IDCV). GÓMEZ RACCIO, ANDREA CECILIA; GAILLARD, MARIA ISABEL; RIVAS, EVA MARIA; BEZRODNIK, LILIANA

Inmunología. Hosp.de Niños Ricardo Gutiérrez.

La IDCV es un síndrome clínicamente heterogéneo caracterizado por hipogamaglobulinemia y alteración funcional de anticuerpos con variable compromiso de la inmunidad celular. Objetivo: presentar la variabilidad clínica y de laboratorio de pacientes (pac) con diagnóstico (dg) de IDCV. Material y Métodos: se analizaron retrospectivamente las historias clínicas de 17 pacientes (5 pac dg posible, 12 pac dg probable). Se realizaron dosajes de inmunoglobulinas, funcionalidad de anticuerpos, fenotipo linfocitario (16/17) y respuesta proliferativa en 2/17. Resultados: la edad de comienzo de los síntomas varió entre 3m-14a, siendo en 15/17 pac antes de los 6a. La mediana de edad al diagnóstico fue 9a 1m (r: 18m-44a 3m). Las infecciones recurrentes de vías respiratorias fueron la forma de presentación más frecuente (14/17), infección de SNC en 1 pac (paraplejía por poliovirus vaccinal). Evolutivamente 16/17 pac presentaron infecciones respiratorias bajas recurrentes, 1/17 infección de SNC (meningitis por Haemophilus influenzae), 4/17 compromiso gastrointestinal, 1/17 púrpura trombocitopénica autoinmune, 1/17 linfoma anaplásico (único fallecido), ninguno granulomas. Se diagnosticaron bronquiectasias en 8/17 pacientes (6/17 al momento de la primera consulta). Presentaron linfopenia CD4 5 pac. (3 con bronquiectasias, 1 con secuela neurológica). Alteración funcional linfocitaria 2 pac. (ambos con bronquiectasias). Conclusiones: Se constata retraso en la sospecha de esta inmunodeficiencia. Todos los pacientes con compromiso celular comenzaron con síntomas antes de los 6a. Se destaca la alta frecuencia de bronquiectasias en este último grupo.

685. (8008) INFECCIONES MICOTICAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRONICA (EGC) PAZ, R; ORNANI, A; KRASOVET, S; ROSENZWEIG, S; ZELAZKO, M; OLEASTRO, M

Inmunología Htal. de Niños «Prof. Dr. J. P. Garrahan»

La EGC es una inmunodeficiencia primaria por defecto de la capacidad microbicida oxígeno-dependiente de los fagocitos, debido a mutación en algún componente del complejo enzimático NADPH oxidasa (gp91; p22; p47; p67). Esto condiciona susceptibilidad a contraer infecciones bacterianas y fúngicas, en particular por microorganismos catalasa positivos. Objetivo: Describir la incidencia, características clínicas, microbiológicas y evolutivas de las micosis en la EGC. Material y Método: Análisis retrospectivo de Historias Clínicas de 35 pacientes (p.) con diagnóstico de EGC seguidos en nuestro servicio entre 1987 y 2004. Ninguno recibió profilaxis antifúngica. Diagnóstico micológico por examen directo y/o aislamiento por cultivo. Resultados 13 p. (12 masculinos y 1 femenino) presentaron infecciones micóticas (37%); 2 de ellos, más de 1 episodio. La primera infección fúngica tuvo una mediana de edad de presentación de 4 años 6 meses (rango: 20 meses- 21 años), siendo la manifestación inicial de EGC en 3 p. (8% del total de EGC). Las micosis fueron: 7 localizadas (unifocal) y 8 diseminadas (multifocal); con localización más frecuente pulmonar (11) y ósea (7). Aspergillus fue el hongo más comúnmente identificado (10). Todos los pacientes requirieron terapia antifúngica; y 8 de ellos, intervención quirúrgica terapéutica. La mortalidad relacionada con infecciones micóticas fue del 30% (4p.) 1) Nuestra incidencia de infección micótica en la EGC fue similar a la descrita en la literatura. 2) Como manifestación inicial de enfermedad fue poco habitual. 3) Observamos prácticamente por igual compromiso uni o multifocal;

resaltando las localizaciones pulmonar y ósea como las más frecuentes. 4) Tal como en otros reportes, el *Aspergillus* fue el patógeno prevalente. 5) A pesar de tratamiento adecuado médico-quirúrgico, las infecciones fúngicas determinaron alta mortalidad.

686. (8011) IDENTIFICACION DE MUTACIONES NUEVAS EN GEN RAG-1 EN PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA (SCID)T-B- PROSPERI, NATALIA; LATTAR, SANTIAGO; PRIETO, EMMA; OLEASTRO, MATIAS; ESPINOSA, FRANCISCO; ZELAZKO, MARTA; DANIELIAN, SILVIA

Area Biología Molecular, Servicio De Inmunología, Hospital De Pediatría «Prof. Dr. Juan P. Garrahan»

Las inmunodeficiencias combinadas severas constituyen un grupo heterogéneo de inmunodeficiencias primarias; algunas debidas a mutaciones en uno de los dos genes activadores de la recombinación (RAG-1 y RAG-2), los cuales median la recombinación V(D)J que lleva al ensamblado de los genes receptores de antígenos. Si bien los hallazgos clínico-inmunológicos proveen información válida para el diagnóstico de SCID, el estudio de mutaciones es el método más fidedigno para el diagnóstico definitivo de deficiencia de RAG-1/RAG-2. En 6 pacientes (5 familias no relacionadas) con diagnóstico de SCID T(-)B(-), analizamos mediante secuenciación directa los genes de RAG-1 y RAG-2. Tres no presentaron cambios con respecto a las secuencias reportadas. En los otros 3, sólo hallamos alteraciones en el gen RAG-1. Identificamos 5 mutaciones: 4 «missense» y 1 «nonsense» y también 2 polimorfismos previamente descriptos. Las mutaciones fueron privativas de cada paciente, no fueron halladas en 50 controles y no están reportadas en la literatura. Resultando, 2 pacientes doble heterocigotas (uno de ellos con 2 polimorfismos heterocigotas) y uno homocigota con un polimorfismo homocigota, siendo el mismo, hijo de padres consanguíneos. La identificación del defecto molecular, permitió en 3 pacientes, realizar diagnóstico definitivo, un correcto asesoramiento familiar y ofrecer la posibilidad de diagnóstico prenatal. Habiendo descartado defectos moleculares en RAG-1/RAG-2 en los otros 3 pacientes, se iniciará el estudio del gen Artemis, recientemente implicado en la recombinación V(D)J, que da lugar a SCID T(-)B(-) con radiosensibilidad.

687. (8040) SINDROME DE CHEDIK HIGASHI: CLÍNICA, EVOLUCIÓN Y TRATAMIENTO. RUPRECHT, BÁRBARA; ORNANI, ALICIA; KRASOVEC, SILVIA; ROSENZWEIG, SERGIO; ZELAZKO, MARTA; OLEASTRO, MATÍAS

Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan

El síndrome de Chediak Higashi (SCH) es una inmunodeficiencia primaria autosómica recesiva caracterizada por infecciones piógenas recurrentes, albinismo oculocutáneo parcial, compromiso neurológico y episodios de fase acelerada (FA). Estos últimos, definidos por fiebre, hepatoesplenomegalia, citopenias hemáticas, coagulopatía e infiltración linfomonocitaria multivisceral provocan la muerte temprana. Las granulaciones gigantes en las células sanguíneas constituyen un dato patognomónico. Describimos las características clínicas, evolución y tratamiento de pacientes (p) con SCH. Método: análisis retrospectivo de historias clínicas de 10 p (5 femeninos; 5 masculinos) diagnosticados en nuestro servicio entre 1987 y 2004. Resultados: los 10 p pertenecían a 9 familias no relacionadas. En 2 casos el diagnóstico se realizó por antecedente familiar positivo. La mediana de edad (ME) de diagnóstico de los restantes 8 fue de 11 meses (r 1-44) y éste se estableció por FA (6) y por el hallazgo de gránulos característicos en el hemograma (2). Todos presentaron albinismo oculocutáneo y 8 desarrollaron FA. La ME de la primera FA fue de 13 meses (r 2-66). En 5 de estos 8 se asoció compromiso del SNC. Los 2 p sin FA correspondieron a un diagnóstico precoz y trasplante de médula ósea (TMO) y a una niña de 2 años 4 meses. Todos los p valorados (9) mostraron franca disminución de la actividad natural killer (NK) y de 5 p evaluables se corroboró neutropenia no relacionada a

FA y/o drogas. Todos los p con FA recibieron drogas inmunosupresoras, falleciendo 5 refractarios al tratamiento (ME: 19 meses). Cuatro recibieron TMO, 2 con éxito y 2 fallecidos por infección inmediata. Destacamos la gran variabilidad en la edad al diagnóstico y falta de sospecha clínica por estigmas físicos característicos. Observamos compromiso neurológico central asociado a FA. La deficiencia constante de la actividad NK demuestra su importancia diagnóstica. El TMO sigue siendo la única posibilidad curativa para los que padecen este síndrome.

INMUNOLOGÍA 11: INMUNOTECNOLOGÍA

688. (6861) DETECCIÓN DE CAJAS RHESUS HIBRIDAS PARA DETERMINAR LA CIGOSIDAD DEL GEN RHD. COTORRUELO, CARLOS; BIONDI, CLAUDIA; GARCÍA BORRÁS, SILVIA; RACCA, LILIANA; RACCA, AMELIA

Area Inmunología. Dpto. Bioquímica Clínica. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

La cigosidad del gen RHD en los fenotipos RhD+ es inferida en términos de probabilidad según el fenotipo Rh completo y las frecuencias de los haplotipos RH en los distintos grupos étnicos. Recientemente se ha descubierto que el gen RHD está flanqueado por secuencias de ADN homólogas denominadas cajas Rhesus. La ausencia del gen RHD responsable del fenotipo RhD- fue el resultado del entrecruzamiento desigual entre las cajas Rhesus 5' y 3' formando una caja Rhesus híbrida en la región de delección. El objetivo de este trabajo fue estudiar la cigosidad del gen RHD por amplificación de cajas Rhesus híbridas y determinar los haplotipos presentes en la población de Rosario. Se estudiaron 106 tríos (padre, madre e hijo). Se determinó el fenotipo Rh por hemaglutinación. La cigosidad RHD fue analizada por estudios familiares y por PCR con cebadores complementarios a secuencias presentes en las cajas Rhesus 5' y 3' que permiten la amplificación de un fragmento de ADN correspondiente a cajas Rhesus híbridas presentes en individuos RhD- y RhD+ heterocigotas. Los cálculos de frecuencia se realizaron con individuos no relacionados. Se tipificaron 179 muestras RhD+ (84,4%) y se detectaron por PCR 75 individuos RHD homocigotas (41,9%) y 104 individuos heterocigotas (58,1%). Estos resultados fueron similares a los publicados para la población caucásica. Sin embargo, se obtuvieron índices de homocigosidad significativamente mayores en los fenotipos DccEe (20% vs 6,6%) y Dccee (16,6% vs 3,3%) debido al aumento del haplotipo Dce. En los individuos con este haplotipo se investigó por PCR la variante alélica Dce(s), que presenta una frecuencia elevada en la población africana y extremadamente baja en europeos, hallándose en un 33% de estos haplotipos. El estudio de las cajas Rhesus híbridas en grupos familiares permitió determinar la cigosidad del gen RHD e identificar los haplotipos en los distintos fenotipos Rh. Estos hallazgos contribuirían a estimar el grado de variabilidad genética y mestizaje en la población analizada.

689. (7123) LIPIDOS DIACETILÉNICOS: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOADYUVANTE DE LIPOSOMAS POLIMÉRICOS. GASPARRI, JULIETA; TAIRA, M. CRISTINA; ALONSO-ROMANOWSKI, SILVIA

Laboratorio de Biomembranas, Universidad Nacional de Quilmes

Los liposomas han sido utilizados como adyuvantes inmunológicos y como sistemas de transporte de una gran variedad de sustancias biológicas a tejidos específicos para aumentar la respuesta inmune a diversos antígenos. Como el material encapsulado es protegido del ataque enzimático hasta llegar al blanco de acción, liberado de manera controlada y particulado por las vesículas, la utilidad potencial de los liposomas ha atraído el interés para su utilización en el desarrollo de nuevas vacunas y sistemas de transporte. La tasa de remoción de los liposomas depende de parámetros como tamaño, composición,

lamelalidad y carga neta superficial, que pueden ser ajustados para lograr una menor eliminación. El uso de liposomas poliméricos adquiere importancia ya que los liposomas más estables permiten un transporte de antígeno más efectivo a las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas inmaduras. Con el fin de evaluar la capacidad inmunoadyuvante de las vesículas poliméricas se administraron distintas dosis de liposomas asociados a la proteína β -lactamasa. Esta proteína no posee capacidad inmunogénica si no es coadministrada con un inmunoadyuvante. Se inocularon ratones Balb/c vía intraperitoneal con liposomas DC8,9PC:DMPC polimerizados, no polimerizados y liposomas formulados con lípidos naturales para comparar la respuesta inmune humoral desarrollada por cada uno de estos sistemas. Luego, se extrajo suero, en el cual se detectó por ELISA la presencia de Inmunoglobulinas totales anti- β -Lactamasa. Como resultado, se observó que los ratones tratados con liposomas poliméricos presentan un título de anticuerpos significativamente mayor que los tratados con vesículas formuladas con los mismos lípidos no polimerizados y con lípidos naturales.

690. (7153) OBTENCIÓN DE UN MODELO ANIMAL DE SOBRE-EXPRESIÓN MIOCARDICA DE HSP70. MIRANDA, S.; LORENTI, A.; BIRNEMBAUM, S.; PRADOS, M. B.; ARGIBAY, P.; MARGNI, R.

IDEHU (CONICET-UBA), Univ. Argentina J.F.Kennedy, IDEHU (CONICET-UBA), ICBME Hosp. Italiano Buenos Aires

La sobreexpresión de hsp70 en ratones transgénicos ha demostrado proteger el miocardio de injuria isquémica con reducción del área infartada. En trabajos previos demostramos que la IL-6 incrementa la síntesis de hsp70 en cultivos de hibridoma de ratón. Considerando antecedentes del empleo de esta citoquina en pacientes, el objetivo del presente trabajo es establecer un modelo animal de protección miocárdica frente a isquemia experimental por terapia con rIL-6. En primer lugar, analizamos la capacidad inductora de la rIL-6 sobre cultivos de cardiomiocitos aislados. Se emplearon ratas Wistar de 4 a 7 días de vida y se aislaron los miocardiocitos por digestión con colagenasa, cultivándolos (4×10^6) células/ml durante 72 hs en presencia o ausencia de 40 ng/ml de rIL-6. La morfología y capacidad contráctil de los miocardiocitos en ambos casos fue similar y óptima. Las células fueron cosechadas y sonicadas y los lisados celulares fueron analizados por western-blot empleando un mA. anti HSP70, un sistema amplificador biotinilado y revelado por quimioluminiscencia. Los resultados obtenidos indicaron que la expresión de hsp70 fue notablemente incrementada en presencia de IL-6. La segunda parte del trabajo consistió en ensayar variantes terapéuticas in vivo con el objeto de inducir el aumento de hsp70 en el tejido cardíaco. Empleamos ratones Balb/c de 3 meses de edad ($n=32$) divididos en 8 lotes, todos inoculados por vía ip: CONTROL (con SF) y lotes A, B y C (con rIL-6): 50 ng (A), 5 ng (B) y 0.5 ng (C). A su vez ensayamos con 1 dosis (Exp. 1) y con 2 dosis iguales separadas 24 hs entre sí (Exp.2). A las 24 hs siguientes se aislaron los miocardiocitos para analizar la expresión de hsp70 y se tomaron muestras de sangre para control de laboratorio. Los resultados obtenidos indicaron los miocardiocitos provenientes de ratones inoculados con dos dosis de 50 ng/ml de IL-6 incrementaron la síntesis de hsp70 en un 100%, sin alterarse los parámetros de laboratorio analizados, sugiriéndose como un modelo terapéutico efectivo.

691. (7233) DESARROLLO DE ELISA PARA CUANTIFICAR IGG E IGM EN LLAMAS. DE SIMONE, EMILIO; SACCODOSI, NATALIA; LEONI, JULIANA

IDEHU-Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET-UBA)

El suero de llama (*Lama glama*) al igual que todos los miembros de la familia Camelidae posee una fracción de IgG convencional (IgGH2L2) y otra carente de cadena liviana (IgGHH). Desde

su primer reporte en 1993 la fracción de IgGHH ha sido motivo de interés por sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Si bien se encuentran disponibles kits comerciales para cuantificar IgG total los mismos se basan en difusión en agar, método no recomendable por el menor peso molecular de las IgGHH, esto nos llevó a desarrollar un ELISA para poder realizar tal cuantificación. Además debido a que en trabajos anteriores observamos una importante fracción de IgM se desarrolló otro ELISA de similares características para poder cuantificarla. Objetivo: Desarrollar un método que permita cuantificar IgG e IgM en suero de llamas. Materiales y métodos: Se produjo suero anti-cadena pesada de IgG y anti-cadena pesada de IgM de llama en conejos. Se probó por Western blot la especificidad y se calculó el título por ELISA. Posteriormente se purificó la IgG del suero de los conejos y se marcó con peroxidasa parte de la misma. Se elaboró un ELISA de captura con IgG de conejo anti-IgG de llama inmovilizada, se utilizó el mismo anticuerpo marcado con peroxidasa para revelar. Además se confeccionó un suero patrón con concentración conocida de IgG para elaborar la curva de medición. Similar procedimiento se realizó con el ELISA de cuantificación de IgM. Resultados: Los resultados de la medición en el suero de 10 llamas arrojaron valores de 6.8 a 9.5 mg/ml de IgG Total y de 0.58 a 0.92 mg/ml de IgM. Conclusión: El desarrollo de estos dos métodos de ELISA nos permitirá evaluar la respuesta inmune de las llamas con mayor precisión que los métodos existentes actualmente en el mercado. La posibilidad de poder cuantificar IgG total e IgM nos permitirá contar con una herramienta de gran utilidad para estudiar en el futuro la respuesta inmune primaria y secundaria en esta especie.

692. (7431) CARACTERIZACIÓN DE EPITOPES CRÍPTICOS Y DE LOS ANTICUERPOS QUE LOS RECONOCEN. LOUREIRO, MARÍA EUGENIA; MARINO, JULIETA; MATHIEU, PATRICIA; ROGUIN, LEONOR; PEÑA, CLARA; RETEGUI, LILIA

IQUIFIB. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.

Los epitopes crípticos son aquellos que se exponen cuando el antígeno (Ag) es alterado por alguna condición física o química. Hemos demostrado previamente que en ciertas condiciones experimentales la proporción de anticuerpos (Ab) dirigidos contra dichos epitopes puede ser mayor que la de los Ab dirigidos contra epitopes nativos. En este trabajo estudiamos sueros que contienen proporciones elevadas de Ab contra epitopes que se exponen en la hormona de crecimiento humana (hGH) y ovina (oGH) insolubilizadas en una superficie plástica; como controles se utilizaron Ab monoclonales (MAb) anti-hGH. Se realizaron ensayos de ELISA de competición a diferentes temperaturas (4, 37 y 56 °C), pH (5.0, 7.4 y 9.0) y fuerza iónica 0, 0.15 y 0.6 M de NaCl). Los resultados indicaron que en ninguna de esas condiciones experimentales variaba la proporción de los epitopes crípticos reconocidos por los Ab, tanto poli como monoclonales. Sin embargo, la temperatura elevada (56 °C) no afectó el comportamiento de los MAb anti epitopes crípticos pero disminuyó significativamente la afinidad de los Ab policlonales. Para caracterizar los epitopes crípticos expuestos por la hGH y la oGH se utilizaron varios péptidos sintéticos que cubren las secuencias 19-128 de la hGH y 94-131 de la oGH, y un fragmento de oGH denominado AB, que contiene la secuencia 6-124 unida a la 150-179. Se observó que ninguno de los péptidos sintéticos fue reconocido por los Ab anti-hGH o anti-oGH, mientras que el péptido AB se comportó en forma similar a la oGH. Resultados similares se hallaron al utilizar la hGH digerida con tripsina: los Ab sólo se unieron a las muestras en las que se conservaban fragmentos de peso molecular cercano a 12000. Los epitopes crípticos de la hGH y la oGH no serían secuencias lineales sino conformaciones que se exponen cuando las hormonas están insolubilizadas; los Ab que reconocen dichos epitopes no presentarían características particulares.

693. (7438) GENERACIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE FRAGMENTOS VHH DE LLAMA ESPECÍFICOS PARA

GLIADINAS Y ESTABLES EN MEDIOS DESNATURALIZANTES. BAYARDO, MARIELA P; URRUTIA, MARIELA; DOÑA, VANINA; ALZOGARAY, VANINA; FOSSATI, ALBERTO; GOLDBAUM, FERNANDO; CHIRDO, FERNANDO

Cátedra de Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. (1900). La Plata. Fundación Instituto Leloir. BsAs

La enfermedad celíaca es una intolerancia permanente a proteínas de trigo, cebada, centeno y avena. Para su tratamiento, los pacientes deben seguir una dieta estricta libre de las proteínas nocivas consumiendo alimentos analizados por un ELISA cuantitativo. Sin embargo, la baja eficiencia de extracción de las proteínas del alimento es una seria dificultad técnica. Para mejorar la extracción se ha propuesto el uso de agentes reductores y desnaturalizantes, pero estos afectan el ensayo inmunoquímico. Sabiendo que los fragmentos VHH de anticuerpos de camélidos presentan una mayor estabilidad que los anticuerpos convencionales, el objetivo de este trabajo fue la generación de una biblioteca de fragmentos VHH y la selección de clones tales que su reactividad inmunoquímica no se altere en condiciones desnaturalizantes. Llamas inmunizadas con gliadinas (proteínas de trigo) desarrollaron alto título de anticuerpos específicos. El cDNA aislado de linfocitos de sangre periférica se utilizó como templado para generar una biblioteca de fragmentos VHHs con alta diversidad, conteniendo 8×10^7 clones independientes. El panning y la selección de la biblioteca se realizó mediante la técnica de display en fagos. Ensayos de unión por ELISA nos permitieron aislar 33 clones con capacidad de unirse a gliadinas. La estabilidad fue evaluada por ELISA indirecto incubando los clones en presencia de etanol (Et), 2-mercaptoetanol (2ME), cloruro de guanidinio (G). Cinco clones fueron estables en Et 15%. Cuatro clones mostraron más de un 50% de reactividad en presencia de 0.5% 2ME y 0.5 mM G. En un ensayo cuantitativo tres clones produjeron una buena curva dosis respuesta. Se ha generado una biblioteca de fragmentos VHH de llama específicos de gliadinas. Los resultados preliminares indican que los fragmentos VHH constituyen un excelente sistema de reconocimiento de antígenos que puede emplearse en condiciones parcialmente desnaturalizantes.

694. (7548) PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS RECOMBINANTES EN E. COLI. SACCODOSSI, NATALIA; DE SIMONE, EMILIO; GELMI, LUCILA; LEONI, JULIANA

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Los anticuerpos de camélidos constituyen una excepción a la estructura básica de las inmunoglobulinas. Existen tres isotipos conocidos de IgG: IgG1, IgG2, IgG3. La IgG1 presenta la estructura convencional de anticuerpo, mientras que la IgG2 (subisotipos a, b y c) y la IgG3 son homodímeros de cadenas pesadas. Poco se sabe de las regiones constantes y de las propiedades inmunológicas de estos anticuerpos no convencionales. La clasificación en isotipos y subisotipos se realizó en base a la estructura de inmunoglobulina y a las secuencias de aminoácidos de las regiones bisagras. Para poder estudiar el comportamiento de anticuerpos de llama (*Lama glama*) frente a distintos antígenos en ensayos de ELISA, nos propusimos obtener antisueros mono-específicos contra los distintos isotipos y subisotipos. El objetivo del presente trabajo es producir péptidos de 10 aminoácidos característicos de las regiones bisagras para ser utilizados como inmunógenos. Para ello se partió de 2 oligonucleótidos sintéticos con una parte de la secuencia complementaria entre sí, para las regiones bisagras de la IgG2b e IgG2c. Se realizó una PCR de 1 ciclo de extensión y se clonó el fragmento de 50 pb en el vector TOPO. Luego de secuenciar las construcciones recombinantes, se realizó una segunda PCR con primers complementarios al vector TOPO; de esta forma se logró amplificar el fragmento deseado y facilitar su posterior manipulación. Tanto el fragmento amplificado como el vector pGEX, el cual codifica para la enzima Glutación S Transferasa con

proteína de fusión, fueron digeridos y ligados. Las secuencias correctas se expresaron en cepas de *E. coli* BL21. Se purificaron las proteínas recombinantes a través de columna de afinidad con glutatión y se comenzaron planes de inmunización en conejos. El diseño de esta estrategia no convencional permitió la expresión de péptidos de pocos aminoácidos en forma recombinante, unidos a una proteína de fusión que actuaría como proteína carrier.

695. (7850) INMUNOFLORESCENCIA ANTÍGENO-ESPECÍFICA (IFAE) EN LA LÍNEA CELULAR GCHO, PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-GAD65 EN PACIENTES DIABÉTICOS. VILLALBA, ANABEL; VALDEZ, SILVINA NOEMÍ; POSKUS, EDGARDO; IACONO, RUBEN FRANCISCO

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

El principal marcador precoz de la Diabetes Mellitus con componente autoinmune es el anticuerpo contra la enzima Glutamato Decarboxilasa (GADA). Nuestro laboratorio ha desarrollado una línea celular CHO-K1 transfectada (GCHO), que expresa en forma estable GAD65 recombinante humana. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método de inmunofluorescencia antígeno específico (IFae), utilizando Trx-GAD65 biotina/Estreptavidina-Fluoresceína como sistema revelador, que permitiera la detección específica de GADA en sueros de pacientes. Los métodos empleados en el presente trabajo fueron: 1) IFae utilizando la proteína de fusión Trx-GAD65-biotina/Estreptavidina-Fluoresceína; 2) digitalización de las imágenes en escala de grises y cuantificación densitométrica de las áreas inmunorreactivas, mediante el uso del software NIH-image. 3) detección de los GADA por ensayo de unión de radioligando (RBA) como análisis de referencia, utilizando el trazador $[^{35}\text{S}]\text{-GAD65}$, expresado en reticulocitos de conejo. Se procesaron simultáneamente 21 sueros de pacientes diabéticos y 24 sueros controles normales (cut-off: densidad media+1 SD). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: de los 21 sueros de pacientes diabéticos evaluados por RBA e IFae, 14 (66%) fueron RBA+ e IFae+, 1 (5%) RBA-IFae+, 5 (24%) RBA+ IFae- y 1 (5%) negativo por ambas metodologías. La especificidad de la IFae, calculada sobre los 24 sueros controles, fue del 92%. La sensibilidad fue estimada a partir de 19 sueros RBA+, de los cuales 14 (74%) fueron IFae+. La IFae representa una interesante herramienta de screening no radiométrica para la detección de GADA en sueros de pacientes diabéticos. Si bien esta variante presentó una menor sensibilidad respecto del método de referencia (RBA), la sensibilidad y especificidad analítica, derivada del revelado antígeno específico, fue superior a la alcanzada con el método de inmunofluorescencia convencional.

696. (7868) FRECUENCIAS ALELICAS DE MARCADORES STR EN UNA POBLACION DE ROSARIO. GARCÍA BORRÁS, SILVIA; COTORRUELO, CARLOS ; RACCA, LILIANA; BIONDI, CLAUDIA ; RACCA, AMELIA

Area Inmunología. Dpto Bioquímica Clínica. Fac.Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

El estudio de los marcadores genéticos permite caracterizar distintas poblaciones y analizar vínculos biológicos. En Argentina varios autores han publicado las frecuencias de los fenotipos del Sistema ABO que varían en distintos lugares del país. En cambio, las frecuencias alélicas de los sistemas STRs (short tandem repeats), que presentan un elevado polimorfismo genético, no han sido totalmente establecidas. El objetivo de este trabajo fue estudiar las frecuencias fenotípicas del sistema ABO y el polimorfismo de nueve locus hipervariables STRs (CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS, vWA, D16S539, D7S820 y D13S317) en una población de Rosario. Se analizaron muestras de sangre periférica de 269 individuos no relacionados biológicamente. Se determinaron los antígenos ABH por técni-

cas de hemaglutinación. Los loci STRs fueron amplificados mediante sistemas de PCR multiplex a partir del ADN obtenido por la técnica de salting-out. Los productos obtenidos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y se tiñeron con nitrato de plata. Se establecieron las frecuencias fenotípicas ABO y las frecuencias alélicas para los loci STRs y se compararon con las publicadas para la población caucásica americana. Todos los loci analizados se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Los resultados obtenidos para los distintos fenotipos del sistema ABO no difirieron de los establecidos para individuos caucásicos. El análisis comparativo de las frecuencias alélicas halladas para los sistemas STRs presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con las reportadas para caucásicos americanos en los loci CSF1PO, TH01, F13A01, vWA y D13S317. En este estudio demostramos que 5 de los 9 loci STRs estudiados presentaron frecuencias alélicas diferentes a las establecidas para individuos caucásicos. La diversidad genética observada en nuestra población demuestra la utilidad de estos marcadores para estudios poblacionales y de identificación humana.

697. (7990) DETERMINACIÓN DEL EPITOPE RECONOCIDO POR UN ANTICUERPO MONOCLONAL (MAB) DIRIGIDO CONTRA RECEPTORES DE VARIAS CITOQUINAS. LONGHI, SILVIA; BELLOC, GABRIEL; PEÑA, CLARA; CORTÉS, MICAELA; RETEGUI, LILIA

IQUIFIB- Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA

En un trabajo previo caracterizamos al MAb R7B4 y demostramos que está dirigido contra un epítopo compartido por los receptores para hormonas de crecimiento (GH), prolactinas (PRL), interleuquina (IL) 2 e IL6. El MAb inhibe la unión de estos ligandos a sus receptores específicos, los cuales se encuentran agrupados en la llamada "superfamilia de receptores para citoquinas" debido a que en la región extracelular contienen cuatro cisteínas cercanas al N-terminal y un motivo de Trp-Ser-X-Trp-Ser (X=cualquier aminoácido). Con el propósito de establecer cuál era el epítopo reconocido por el MAb R7B4 se eligieron decapeptidos, correspondientes a los receptores para GH, PRL, IL2, IL4, IL5, IL6 e IL7 de diferentes especies, que contenían el motivo Trp-Ser-X-Trp-Ser. Mediante la técnica denominada PEPSCAN se sintetizaron dichos decapeptidos en fase sólida y se midió su unión al MAb R7B4 por ELISA. De los treinta y cuatro péptidos sintetizados, veinticuatro fueron reconocidos por el MAb, resultados que permitieron establecer la secuencia consenso His-Gly-Tyr-Trp-Ser-Glu-Trp-Ser-Pro-Glu para el epítopo reconocido por el Ab. Posteriormente se preparó el péptido sintético Gly-Tyr-Trp-Ser-Glu-Trp-Ser-Pro-Glu, el cual se utilizó como inmunógeno en ratones para obtener sueros que simularan la acción del MAb R7B4. Resultados preliminares indican que la unión de la 125I-hGH a los receptores presentes en hígado de rata disminuye en presencia de dichos sueros. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la secuencia consenso determinada por PEPSCAN representaría el epítopo reconocido por el MAb R7B4.

INMUNOLOGÍA 12: INMUNOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR TRYPANOSOMA CRUZI

698. (7413) IFNG Y TNFA ENDÓGENOS ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN POR VÍA CLÁSICA DE MACRÓFAGOS DE RATONES C57BL/6 INMUNIZADOS CON CRUZIPAÍNA. GUIÑAZÚ, N; PELLEGRINI, A; CANO, R; AOKI, MP; CARRERA, EA; GEA, S

CIBICI-CONICET, Inmunología, Dpto de Bioquímica Clínica, Facultad de Cs Qcas, U.N.C.

Previamente reportamos que esplenocitos de C57BL/6 inmunizados con cruzipaína (Cz) exhiben un perfil Th1 (Guiñazú et al, 2004) y Células Adherentes de Bazo (CAB) se activan por vía clásica frente a Cz. Con el propósito de profundizar en los mecanismos involucrados en esta vía se analizaron los niveles de

nitritos por reacción de Griess, IFNg por ELISA, la tasa de infección y el efecto de la neutralización de IFNg/TNFa. CAB fueron obtenidas de ratones C57BL/6 de 8 semanas, normales o 14 días post inmunización id con 3 dosis de 10ug/ratón de Cz (inmune) u OVA (control). CAB (2x10(6) cel/ml) fueron cultivadas con Cz (10 mg/ml) o mantenidas en medio por 24 hs y luego infectadas con tripomastigotes (1:2) por 36 hs adicionales. Se observó un incremento significativo en los niveles de óxido nítrico (ON) en sobrenadante de cultivo de cel inmunes respecto de los controles estimuladas con Cz (16,9±2 vs 3±0,5 mM) o medio (9,9±1,1 vs 4,4±0,6 mM). Además el nº de cel. infectadas/100 cel, así como el nº de parásitos/100 cel. fue significativamente menor en inmunes vs controles (9,4±3,5 vs 27,5±3,8; 10±4 vs 30,25±5,3 respectivamente). Considerando que citoquinas como TNFa e IFNg facilitan la activación clásica de macrófagos, se evaluaron los niveles de IFNg en el sobrenadante de cultivo al estimular con Cz, inmunes vs controles (5238±297 vs 1636±228 pg/ml). El compromiso de TNFa e IFNg fue evaluado por neutralización con mAbs (10 mg/ml). El análisis de los niveles de ON demostró una disminución parcial del mismo por efecto de la neutralización de IFNg. Notablemente, neutralizando ambas citoquinas los niveles de ON descendieron en inmunes de 41,9 a 4 y en controles de 5 a 3,4 uM. CAB normales no se activaron por vía clásica frente al estímulo con Cz in vitro. En conjunto los resultados sugieren que TNFa e IFNg inducidos por Cz condicionan la respuesta efectora de los macrófagos, en una cepa de ratones resistentes a la infección con T cruzi, favoreciendo el control de la misma.

699. (7432) EFECTO DE LA RE-EXPOSICIÓN AL TRYPANOSOMA CRUZI EN ÁREA ENDÉMICA SOBRE EL ESTADO DE DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+ ALBAREDA, MC; LAUCELLA, SA; ALVAREZ, MG; BARBIERI, G; TARLETON, RL; POSTAN, M

Instituto Nacional de Parasitología «Dr Mario Fatale Chabén», Buenos Aires; University of Georgia, USA, Universidad Católica de Santiago del Estero, Santiago del Estero

Recientemente, se ha propuesto un modelo de diferenciación de linfocitos T CD8 en el que linfocitos poco diferenciados (CD27(+)/CD28(+)), con alta capacidad linfoproliferativa y baja capacidad efectora, progresan a un estadio completamente diferenciado (CD27(-)/CD28(-)) con gran actividad efectora. Estudios previos de nuestro laboratorio realizados en pacientes chagásicos crónicos residentes en la provincia de Bs.As. por más de 10 años, mostraron un perfil efector de la población de linfocitos T CD8+ total (CD27(-)/CD28(-)/CCR7(-)), que no se correlacionó con el estado de activación, determinado por la expresión de los marcadores Bcl-2, Ki67 y CD38. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la re-exposición al parásito sobre el estado de diferenciación y activación de linfocitos T CD8+ totales en 9 pacientes chagásicos crónicos y 10 individuos seronegativos que viven en áreas endémicas de Santiago del Estero, con transmisión reciente. Se determinó por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD27, CD28, Bcl-2, Ki-67 y perforina en linfocitos T CD8+ periféricos. La subpoblación de linfocitos T CD8(+)/CD27(+)/CD28(+) en los pacientes chagásicos residentes en zona endémica fue significativamente mayor (media±/DS=52.5±/27.2) que en los pacientes residentes en Bs. As. (media ±/DS=11±/7.9; $p < 0.003$). Por otro lado, se detectó una disminución en la expresión de Bcl-2 evidenciando un estado de mayor activación en los pacientes de zona endémica (Santiago, media±/DS=8.5±/1.8; BsAs, media±/DS=93.7±/4.8; $p < 0.0001$) respecto a los de Bs As. La menor diferenciación de la población de linfocitos T CD8+ en los pacientes de zona endémica en comparación con los residentes en Bs. As. podría relacionarse a un arresto en la maduración de esta población linfocitaria por la re-exposición al T. cruzi, y a una constante activación del sistema inmunológico.

700. (7504) ESTUDIO DEL ROL DE C-JUN NH2 TERMINAL KINASA (JNK) EN LA INDUCCIÓN DE ARGINASA Y EN

EL CRECIMIENTO INTRACELULAR DEL TRYPANOSOMA CRUZI EN MACRÓFAGOS. STEMPIN, CINTHIA ; CERBAN, FABIO

CIBICI-CONICET. Inmunología. Dpto. Bioq. Clínica. Fac. Cs. Quím. Universidad Nacional de Córdoba.

La inducción de arginasa (Arg) mediada por cruzipaina (Cz) involucra la activación de múltiples señales intracelulares como Tirosin Kinasas (TK), Protein Kinasa A (PKA) y p38 MAPK; la inhibición de estas señales modifica el balance iNOS/Arg a favor de iNOS, favoreciendo el control de la replicación parasitaria en macrófagos (Mo) activados con Cz e infectados con T. cruzi. PKC y p44/p42 MAPK no están involucradas en la inducción de Arg. Para completar el estudio de las MAPKinasas, en este trabajo se analizó el rol de JNK. Para ello, células (Cel) J774 fueron tratadas 6 h con el inhibidor específico de JNK (SP600125 [SP]) previo al estímulo de 18 h con Cz o IL13, que es un fuerte inductor de Arg. En estas Cel se evaluó actividad de Arg o se las infectó con tripomastigotes (Tp) (4Tp/Cel) durante 24 h. En las Cel tratadas con SP y estimuladas con Cz o IL13 no se modificó la actividad de Arg respecto de las Cel tratadas sólo con Cz o IL13. En las Cel tratadas con SP se produjo un aumento de amastigotes (Ama) a las 72 h post-infección (p.i.), fenómeno que se potenció cuando se agregó Cz o IL13. El número de Ama en Mo se correlacionó en forma inversa con los niveles de nitritos en los diferentes cultivos. Además, SP disminuyó la producción de nitritos en Cel J774 estimuladas con LPS. Para conocer el rol de JNK in vivo se infectaron ratones BALB/c con 500 Tp y se estudió el grado de infección en Mo de bazo a los 19 días p.i. cuando la actividad y expresión de Arg I son máximas. El tratamiento de los Mo ex vivo con SP fue capaz de aumentar el número de Ama, como control de inhibición de iNOS y Arg se utilizaron LNMMA y NOHA, respectivamente. Por último se estudió la fosforilación de las MAPK en extractos de Cel J774 tratadas con Cz o IL13. El estudio mostró que Cz al igual que IL13 induce la fosforilación de p38 pero no de p44/p42 MAPK ni de JNK. La inhibición de JNK no afecta la inducción de Arg pero produce una inhibición parcial de iNOS que favorece el crecimiento intracelular de T. cruzi.

701. (7511) SÍNTESIS DE ESTEROIDES POR MACRÓFAGOS DE RATAS "L" CULTIVADOS CON O SIN TRYPANOSOMA CRUZI. VACCHINA, PAOLA; VALDEZ, RICARDO (1); REVELLI, SILVIA; ROMANO, MARTA (1)

Inst. Inmunología. Fac. Cs. Méd. UNR, Argentina; Dpto. Fisiol., Biofís. y NC. Cinvestav, México

Existe abundante información sobre la interacción bidireccional entre los sistemas inmunológico y endócrino. Estas interacciones juegan un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades infecciosas. El Trypanosoma cruzi (Tc), parásita entre otras células a los macrófagos, los que juegan un papel fundamental en la transformación del parásito y en el control de la infección. Las hormonas esteroides como la dehidroepiandrosterona (DHEA) y sus derivados androgénicos y estrogénicos son inmunomoduladores. Se ha reportado que la fagocitosis por macrófagos es afectada por estrógenos y que estas células son capaces de transformar DHEA en otros metabolitos esteroides. Hemos demostrado previamente que parásitos como el cisticerco alteran los perfiles hormonales del huésped y son además capaces de transformar esteroides. En el presente trabajo se investigó si los macrófagos de ratas "L" son capaces de metabolizar esteroides y si este proceso es afectado por la infección con Tc. Con este objetivo se extrajeron y cultivaron macrófagos de la cavidad peritoneal, activados con INF-gama-r-rata (Scand. J. Immunol.: 58:173, 2003). A las células se les agregó 3H-DHEA, en presencia o ausencia de Tc. Después de diferentes tiempos en cultivo se separó el medio y se extrajeron los esteroides. Alícuotas del medio y estándares auténticos se procesaron por cromatografía en capa fina (TLC). Este procedimiento permitió detectar la transformación de 3H-DHEA a 3H-androstenediol (5.53% ± 1.20 a las 24 hs y 6.47% ±

0.99 a las 48 hs). La presencia de Tc aumentó la conversión de DHEA a androstenediol. También se detectaron pequeñas cantidades de 3H-testosterona (menos de 1%) y estrógenos. 3H-testosterona fue también más abundante en los macrófagos infectados. Esto sugiere que los macrófagos tienen las enzimas esteroidogénicas necesarias para metabolizar DHEA, y que la infección con Tc aumenta la presencia de esteroides derivados de este andrógeno en el medio de cultivo.

702. (7683) ROL DE INTERLEUQUINA (IL) -6, -1 BETA Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (FNTA) EN LA INFECCIÓN AGUDA CON TRYPANOSOMA CRUZI (TC) Y ACTIVACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIO-ADRENAL EN RATONES C57BL/6. PÉREZ, ANA ROSA; DEL REY, ADRIANA (2); BESEDOVSKY, HUGO (2); ROGGERO, EDUARDO; BOTTASSO, OSCAR

Inst. Inmunología, Fac. Cs. Médicas-UNR, Inst. de Fisiol. Normal y Patológica, Marburg, Alemania (2)

Sumado a su participación en la respuesta anti-infecciosa, IL-6, IL-1beta (b) b y FNTa activan el eje HPA con la liberación de glucocorticoides (corticosterona -CT- en ratón), en un proceso donde IL-1b y FNTa serían más relevantes. Dado el aumento en plasma de CT en ratones C57BL/6 (B6) con infección aguda con Tc, se analizó si defectos en la acción de IL-1b o FNTa repercutían sobre el curso de la infección y la activación del eje HPA. Tres grupos de ratones B6 (n=4-5/grupo), "wild type" (G1) o deficientes (knock out) en ambos receptores de FNTa (G2) o en el receptor de IL-1b (G3) se infectaron con 100 tripomastigotes -Tulahuén. Además del monitoreo estándar, al día 15 post-infección (pi) se analizaron los niveles circulantes de CT (RIA), IL-6, IL-1b y FNTa (ELISA). Para G2 y G3 se calculó el aumento relativo (AR, %) respecto de G1 al mismo día pi. La mortalidad fue del 100% en los 3 grupos, pero G2 tuvo una menor sobrevivencia (p<0.01 vs. G1; p<0.05 vs. G3) y mayor parasitemia (p<0.014 vs. G1 y G3). Los valores de CT (µg/dl, media±es) fueron superiores en G1 (6.7±0.5) respecto de los no infectados (B6-Co: 2.7±0.7 p<0.05). Los AR de CT fueron G2=730±220 y G3=123±40 (G2 vs. G1 o G3, p<0.014 y p<0.04, respectivamente). La IL-6 en G1 fue (527±74 pg/ml), no detectándose en B6-Co (p<0.05); con los siguientes AR, G2: 400±110 (p<0.014 vs. G1), G3: 140±20 (p<0.05 vs. G1; p<0.014 vs. G2). G1 tuvo niveles aumentados de IL-1b y FNTa (p<0.014 vs. B6-Co). En cuanto a G2 y G3, se consignaron los AR para las citocinas cuyos receptores eran funcionales, IL-1b en G2=460±270 (p<0.014 vs. G1), FNTa en G3=100±10 (no significativo vs. G1). El defecto en la señalización de FNTa agrava aún más la severidad de la enfermedad y exagera la producción de IL-1b, que conduciría a una mayor activación del HPA con valores de CT potencialmente perjudiciales.

703. (7705) LA INHIBICIÓN DE GLUCOCORTICOIDES (GCS) PREVIENE LA APOPTOSIS DE TIMOCITOS SIN MODIFICAR EL AUMENTO EN LA EXPORTACIÓN TÍMICA DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA CON TRYPANOSOMA CRUZI (TC) EN RATONES C57BL/6. PÉREZ, ANA ROSA; NICORA, ALICIA; PALAZZI, JORGE; BESEDOVSKY, HUGO (2); DEL REY, ADRIANA (2); ROGGERO, EDUARDO; BOTTASSO, OSCAR

Inst. Inmunología, Fac. Cs. Médicas-UNR; Inst. Fisiol. Normal y Patológica, Marburg, Alemania (2)

La infección aguda con Tc en ratones C57BL/6 presenta una depleción de timocitos, con un aumento en la apoptosis y exportación tímica, al igual que los niveles séricos de Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNTa) y GCS. Para analizar el efecto del bloqueo en la producción y en la acción de los GCS, sobre los cambios tímicos se trabajó con ratones adrenalectomizados (Adx) o no (Sham) 7 días antes de la infección (100 tripomastigotes -Tulahuén), que recibieron RU486 (antagonista del receptor de GCS) 1mg/día a partir del día 8 post-infección (pi, -AdxRU). Al día 15 pi se analizó el peso relativo del timo (PR), apoptosis de

timocitos, porcentaje de células CD4+CD8+ (DP) y exportación de timocitos a ganglios y bazo. Se incluyeron controles simultáneos (Sham-Co). Los resultados se expresaron como media±es; n=4-6/grupo. El PR disminuyó en los ratones Sham+Tc (vs. AdxRU+Tc $p<0.03$; vs. Sham-Co $p<0.02$). La apoptosis por citometría (%) fue similar en los Sham-Co (4.1 ± 0.44) y AdxRU+Tc (5.1 ± 1.2) mientras que en los Sham+Tc (16.26 ± 3.2) estuvo elevada (vs. AdxRU+Tc $p<0.03$, vs. Sham-Co $p<0.02$). Los timocitos DP disminuyeron en los animales Sham+Tc (vs. AdxRU+Tc $p<0.03$, vs. Sham-Co $p<0.02$). La exportación se estimó 24 h después de la inoculación intratímica de FITC, observándose un aumento de la emigración en los grupos AdxRU+Tc y Sham+Tc ($p<0.03$ y $p<0.02$, vs. Sham-Co, respectivamente). El nivel de exportación en los grupos AdxRU+Tc y Sham+Tc fue similar. El grupo AdxRU+Tc mostró menor sobrevida ($p<0.05$ vs. Sham+Tc) y mayores niveles séricos de FNTa (pg/ml, 724 ± 184 día 15 pi) comparado con Sham+Tc (160 ± 12 ; $p<0.02$) y Sham-Co (indetectable, $p<0.002$). En este modelo, la apoptosis de timocitos aparece mediada por los GCs, mientras que la exportación de timocitos no se hallaría influenciada por los mismos.

704. (7725) MODIFICACIONES EN LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PERIFÉRICO DURANTE EL CURSO DE UNA INFECCIÓN AGUDA CHAGÁSICA EN RATONES C57BL/6. QUAGLIA, NORA; POLLACHINI, NATALIA; PÉREZ, ANA ROSA; WIDMANN, JOHANN (2); BOTTASSO, OSCAR; ROGGERO, EDUARDO; BESEDOVSKY, HUGO (2); DEL REY, ADRIANA (2)

Inst. Inmunología, Fac. Cs. Médicas-UNR; Inst. Fisiol. Normal y Patológica, Marburg, Alemania (2)

Las interacciones neuroinmunoendócrinas son una serie de procesos donde los mecanismos inmunoregulatorios ejercidos por el control neuroendócrino y nervioso son a su vez influenciados por las citocinas producidas por la respuesta inmune. Dado que la infección aguda con Tc en ratones C57BL/6 mostró un incremento de citocinas proinflamatorias y de corticosterona (CT), se estudió el contenido de monoaminas a nivel central y periférico y su posible relación con mediadores inmunoendócrinos; en el mismo modelo. En 2 grupos de ratones C57BL/6, (n=4-7/grupo), controles (C) e infectados (Tc, 100 tripomastigotes) se estudiaron (17 días post-infección) los niveles plasmáticos de interleucocinas (IL)-1beta (b), IL-6, Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNTa) (ELISA) y CT (RIA; µg/dl). Se midió el contenido de norepinefrina (NE) y serotonina (5-HT) y sus respectivos metabolitos (3-metoxi,4-hidroxifeniletilenglicol -MHPG- y ácido 5-hidroxiindolacético -5-HIAA-) en tallo encefálico (Te), hipotálamo (Hp) e hipocampo (Hc); y NE en bazo (HPLC; ng/g tejido). El metabolismo de NE y 5-HT se analizó por la relación MHPG/NA y 5-HIAA/5-HT. El contenido de NE en Te e Hc fue menor en Tc ($p<0.05$ vs. C); observándose un descenso en su metabolismo en Te (MHPG/NA (media ± es, C: 0.076 ± 0.009 , Tc: 0.060 ± 0.004 ; $p<0.05$). El contenido de NE en bazo de Tc (20 ± 2) fue el 8% del observado en C (267 ± 4). No hubieron diferencias en el contenido de 5-HT, pero el metabolismo disminuyó en el Hc del grupo Tc ($p<0.05$ vs. C). Los niveles de las 3 citocinas y CT aumentaron significativamente en Tc; ej. FNTa: (pg/ml) C= 13 ± 1 , Tc= 357 ± 42 ; CT: C= 2.14 ± 1.24 ; Tc= 9.3 ± 1.77 ($p<0.05$, ambos casos). El aumento de CT en Tc está vinculado con el incremento de citocinas proinflamatorias. La disminución de la actividad noradrenergica sugiere que la infección afecta funciones del sistema nervioso central y periférico.

705. (7759) ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS DE TRYPANOSOMA CRUZI EN RATAS DE DIFERENTES EDADES. MARTIN, ANA PAULA; PASCUTTI, FERNANDA; WOJDYLA, DANIEL; CAPRIOTTI, GUSTAVO (1); REVELLI, SILVIA

Instituto de Inmunología, Facultad de Cs. Médicas. UNR (1) Wiener Lab

El desafío con T. cruzi en ratas «I» al destete (D, 21-28 días, 1.10(6) tripomastigotes, cepa Tulahuén, vía sc) provoca una enfermedad aguda que se resuelve dentro del mes; en los animales adultos (A, 70-120 días, 7.10(6) tripomastigotes) la infección es de menor jerarquía con escasas parasitemias. El mejor manejo de la infección en las ratas adultas se asocia con una respuesta de anticuerpos (Ac) IgG e IgM específicos totales más apropiada en el tiempo. En el presente trabajo se analizó la respuesta de Ac específicos contra 6 antígenos (Ag) de T. cruzi en los grupos D y A, para ver si existían relaciones entre la respuesta a determinados Ag y la protección contra el parásito. Se obtuvieron muestras de suero de animales D y A infectados según el modelo descripto, a los 7, 14, 28 y 60 días post-infección, en donde se investigó por ELISA la presencia de Ac IgG específicos contra los Ag 1, 2, 13, 30, 36 (Mol Biochem Parasitol 25:175, 1987) y SAPA. Se encontraron Ac específicos contra todos los Ag estudiados en los animales infectados y se observaron respuestas diferentes en ambos grupos para varios de ellos, ej: (mediana, rango, 3-4 ratas/grupo), Ac anti-SAPA (DO), día 14 pi: D 1.595 (0.864-1.295), A 0.002 (0.002-0.005), $p<0.05$; día 60 pi: D 2.156 (1.299-2.501), A 0.556 (0.111-1.137), $p<0.05$; Ac anti-Ag 30, día 28 pi: D 0.163 (0.003-0.418), A 1.477 (1.088-2.121), $p<0.05$; Ac anti-Ag 1, día 7 pi: D 0.005 (0.004-0.006), A 0.370 (0.169-0.711), $p<0.05$. Se evidenciaron patrones de respuesta diferentes a Ag de T. cruzi en las ratas de diferente edad. En las ratas D hubo un paralelo entre parasitemias bien evidentes y mayor cantidad de Ac contra SAPA; estos hallazgos coinciden con otros estudios donde tales Ac no se relacionaron con respuesta protectora. La coexistencia entre bajas parasitemias y mayores niveles de Ac contra otros Ag de las ratas A, sugiere que tales inmunoglobulinas se hallarían implicadas en la protección.

706. (7796) AUSENCIA DE UNION ENTRE ANTICUERPOS ANTI-SULFATIDO DE RATAS INFECTADAS CON TRYPANOSOMA CRUZI Y MIELINA DE FIBRAS NERVIOSAS VAGALES HOMOLOGAS. BERRA, HéCTOR HUGO; GARCÍA, GRACIELA (1); MARTÍNEZ, ALEJANDRA (1); SVETAZ, MARÍA J. (2); FELDMAN, SARA (3)

Cátedra Fisiología Humana. Fac. Cs. Médicas. Universidad Nacional de Rosario, ARGENTINA. (1). Cát. Morfología y (2). Inmunidad Celular, Fac. Cs. Bioq. y Farm. (3). Cát. Bioquímica, Fac. Cs. Médicas

Los fenómenos autoinmunes se han propuesto entre los mecanismos productores de daño nervioso en la enfermedad de Chagas. En un trabajo previo, en ratas "I" infectadas experimentalmente con T. cruzi (10(6) tripomastigotes de la cepa Tulahuén, por vía subcutánea), encontramos títulos elevados de anticuerpos (Ac) anti-sulfátido, que se unían a la mielina en el cerebro anterior (Parasitol Res 1999; 85: 446-451). En este trabajo, se estudió si los mismos Ac eran capaces de unirse a la mielina de las fibras nerviosas vagales preganglionares. Para ello, en el mismo modelo se obtuvieron, durante la etapa aguda de la infección, fracciones de IgG anti-sulfátido enriquecidas. El nervio vago fue disecado por detrás de la aurícula derecha y extraído, bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg / kg peso), en 6 ratas normales (GC), 6 infectadas durante el período agudo (GIA) y 6 durante el período crónico (GII). La presencia de mielina en el nervio fue confirmada por histoquímica con Luxol Fast Blue. Para los estudios de inmunofluorescencia, los cortes se incubaron con IgG anti-sulfátido y posteriormente con IgG anti-rata conjugada con isotiocianato de fluoresceína y contra-teñidos con azul de Evans. En ninguna de las pruebas realizadas se detectaron uniones entre Ac anti-sulfátido y las vainas de mielina de las fibras vagales en los GC, GIA y GII. La discrepancia, entre estos resultados y los encontrados en el sistema nervioso central, podría obedecer a las diferencias cuali-cuantitativas en la composición lipídica y proteica de la mielina en ambos sectores.

707. (7951) APOPTOSIS DE LINFOCITOS B PERITONEALES EN LA INFECCIÓN CON TRYPANOSOMA CRUZI: PAR-

TICIPACIÓN DE IFN-GAMMA. MERINO, MC; MONTES, CL; ACOSTA-RODRIGUEZ, EV; GRUPPI, ADRIANA

CIBICI. Departamento de Bioquímica Clínica. Fac. de Cs. Qcas. UNC

La cavidad peritoneal alberga linfocitos (Li) B2 y B1, productores de anticuerpos (Acs) que participan en el clearance de patógenos. Previamente reportamos que, a los 10-15 días post-infección, los ratones infectados (I) con *T. cruzi* muestran un incremento significativo en el número (n°) total de células peritoneales comparado con animales normales (N). Sin embargo los ratones I muestran un n° reducido de LiB, que mueren por apoptosis, y un aumento en el n° de LiT, principalmente CD8+. En este trabajo observamos que los LiB2 desaparecen de peritoneo con una cinética más acelerada que la de los LiB1, (LiB2: I día 6: 12.40%, y día 15: 5.47% vs N: 14.48%. LiB1: I día 6: 46.63%, día15: 36.75% vs N: 53.33%), y este comportamiento es directamente proporcional a la cantidad de parásitos infectantes. Analizando posibles mediadores de la apoptosis de LiB peritoneales, observamos que sobrenadantes de cultivo de células de animales I presentan niveles mayores de IFN-gamma e IL-10 comparados con sobrenadantes de células de animales N. El aumento de IFN-gamma e IL-10 se correlacionó con un mayor porcentaje (%) de células productoras de estas citoquinas en los animales I, determinado por citometría de flujo intracelular (IFN-gamma: I día 12: 14.7±1.13% vs N: 5.65±1.06%. IL-10: I día 12: 24.2±4.67% vs N: 12.2±0.42%). Evaluando si estas citoquinas median la apoptosis, observamos que el agregado de rIFN-gamma induce apoptosis de LiB puros obtenidos de animales N. El mayor % de muerte inducida por rIFN-gamma se detectó en las células IgM low (B2). Sin embargo cuando los LiB peritoneales son activados con LPS resisten a la muerte inducida por rIFN-gamma (% de células apoptóticas: basal: 42.3%, con rIFN-gamma: 63.0%, con LPS: 28.1%, con LPS+rIFN-gamma: 32.7%). Los resultados sugieren que en la infección con *T. cruzi* se producen citoquinas con actividad pro-apoptótica que llevan a la muerte de LiB evitando la producción de Acs efectores.

708. (8074) MOLÉCULAS CO-ESTIMULATORIAS CD86, CD80, CD40, Y MHC-II SON DIFERENCIALMENTE INDUCIDAS POR CRUZIPAÍNA EN LINFOCITOS B DE RATONES BALB/C Y C57BL/6. PELLEGRINI, ANDREA; GUIÑAZÚ, NATALIA; AOKI, PILAR; CARRERA, ANTONIO; GEA, SUSANA

Inmunología. CIBICI-CONICET. Fac. de Cs Qcas. UNC

Ratones BALB/c son susceptibles mientras que C57BL/6 son resistentes a la infección con *Trypanosoma cruzi* y a la autoinmunidad cardíaca. Previamente demostramos que la inmunización de BALB/c con un antígeno inmunogénico del parásito, cruzipaina (Cz), induce un incremento en linfocitos B esplénicos (LB), asociado con la presencia de anticuerpos contra antígenos cardíacos y citoquinas Th2. En C57BL/6 no se observó autoinmunidad, ni cambio en el número de LB y los esplenocitos produjeron citoquinas Th1. Además Cz indujo en BALB/c un mayor porcentaje LB que expresan el marcador CD23 respecto de C57BL/6. El objetivo de este trabajo fue profundizar el estudio del LB, debido a que actúa como célula presentadora de antígenos en fases efectoras de patologías autoinmunes, principalmente de tipo Th2. Para ello 14 días post inmunización id con 3 dosis de 10ug/ratón de Cz, en ambas cepas, se analizó la expresión de MHC-II, CD86, CD80 y CD40, en LB de células totales de bazo frescas, mantenidas con medio de cultivo o estimuladas con Cz por 24hs. Resultados: Se observó un incremento en la IFM de ciertos marcadores de activación de LB en fresco de BALB/c comparados con C57BL/6, MHC-II (239±77 vs 145±20), CD40 (65±4 vs 37±3). LB de BALB/c presentaron mayor IFM de CD40 respecto a C57BL/6, al ser mantenidas con medio (137±9 vs 55±8) o estimuladas con Cz (147±12 vs 68±8). Además Cz indujo un mayor porcentaje de LB CD86+ de BALB/c en relación a C57BL/6 (73±9% vs 50±6%). La IFM de MHCII reveló que LB de BALB/c son más fuertemente estimulados por

Cz in vitro que LB de C57BL/6 (540±60 vs 173±21). Se observaron importantes diferencias en la expresión de CD86, CD40 y MHC-II en LB entre la cepa BALB/c y C57BL/6. Sugiriendo que la cepa susceptible a la autoinmunidad, al ser inmunizada con Cz, muestra una mayor activación en sus LB lo cual podría estar comprometido en la ruptura de la tolerancia inmunológica hacia antígenos cardíacos y la producción de autoanticuerpos.

INMUNOLOGÍA 13: INMUNOTERAPIA

709. (6967) LA INMUNIZACIÓN CON CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRATADAS CON OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS ANTISENIDO (AS[S]ODN) AL ARNM DEL IGF-IR TIENE UN EFECTO ANTITUMORAL MEDIADO POR LINFOCITOS CD8+ VÍA FAS/FASL. SALATINO, MARIANA; SCHILLACI, ROXANA; GIAMBARTOLOMEI, GUILLERMO (1); PROIETTI, CECILIA; CASSATARO, JULIANA (1); CARNEVALE, ROMINA; CHARREAU, EDUARDO; ELIZALDE, PATRICIA V

Instituto de Biología y Medicina Experimental; (1) IDEHU, Laboratorio de Inmunogenética, UBA

Las evidencias indican que el efecto antitumoral del AS[S]ODN al IGF-IR involucra también una respuesta inmune del huésped. En el presente trabajo evaluamos la capacidad que tiene la inoculación de células tumorales tratadas con AS[S]ODN al IGF-IR para proteger de un desafío tumoral y estudiar la respuesta inmune desencadenada. Para ello, se inyectaron ratones hembra Balb-c cada 15 días, en 3 dosis de 2x10(6) células del tumor mamario murino progestágeno-dependiente C4HD tratadas por 48hs con MPA (acetato de medroxiprogesterona) + 2µM AS[S]ODN e irradiadas y se desafiaron 15 días después con el tumor C4HD. Como control se inocularon ratones con PBS o con células tratadas con MPA o MPA+[S]ODN sentido (S[S]ODN). El crecimiento tumoral en los animales inoculados con células tratadas con el AS[S]ODN al día 21, mostró una inhibición del 53%, 61.6% y 60.2% con respecto a los grupos PBS, MPA y S[S]ODN respectivamente (P<0.001). El efecto antitumoral fue específico, pues no se observó protección cuando se desafió con los tumores mamaros 60 o LM3. La inmunización en ratones Nude no inhibió el crecimiento del tumor C4HD demostrando la dependencia de linfocitos T. Ensayos de hipersensibilidad retardada, citotoxicidad por liberación de (51)Cr y proliferación de esplenocitos, confirmaron que la inmunización gatilló una respuesta inmune celular. Mediante un ensayo de citotoxicidad comprobamos, por depleción selectiva, que el efecto era CD8(+)-dependiente y que involucraba la activación de la vía Fas/FasL pues fue bloqueado por Brefeldina A o por un anticuerpo anti-FasL. En conclusión, demostramos que la inmunización con células C4HD tratadas con el AS[S]ODN al IGF-IR inhibe el crecimiento del tumor C4HD al inducir una respuesta celular CD8(+)-dependiente que involucra la activación de la vía citolítica de Fas/FasL.

710. (7243) COMPARACIÓN DE DISTINTOS PROCEDIMIENTOS DE INMUNOTERAPIA CONTRA UN TUMOR MURINO. CHIARELLA, PAULA; VERMEULEN, MÓNICA; BUSTUOABAD, OSCAR DAVID; JENSEN, FEDERICO; VULCANO, MARISA; RUGGIERO, RAÚL ALEJANDRO

División Medicina Experimental y Sección Inmunología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina

Hemos comparado la eficacia de tres posibles tratamientos inmunoterapéuticos contra el fibrosarcoma murino MC-C: 1) Transferencia adoptiva de linfocitos inmunes, 2) Tratamiento con células MC-C irradiadas, 3) Tratamiento con células dendríticas (DC) activadas con extracto acelular del tumor MC-C. La activación de las DC se evaluó por citometría de flujo por la expresión de los marcadores CD40 y CD86. Se utilizaron como controles DC no activadas o activadas con LPS. Los tres procedimientos fueron eficaces para prevenir el desarrollo de implantes con cé-

lulas MC-C vivas: la transferencia adoptiva fue eficaz cuando 100 millones de esplenocitos de ratones inmunes fueron transferidos por vía endovenosa un día antes del inóculo subcutáneo con células MC-C. Los otros dos procedimientos fueron efectivos cuando se llevaron a cabo 7-14 días antes del desafío tumoral. En ratones tratados con células MC-C irradiadas sólo creció el tumor en 1 de 12 ratones inoculados con células MC-C vivas, contra 12 de 12 en ratones controles ($p < 0.01$). En ratones tratados con DC activadas con extracto de MC-C, sólo creció el tumor en 1 de 6 animales inoculados con células MC-C vivas contra 17 de 18 en los controles ($p < 0.01$). Por otro lado, sólo el tratamiento con DC activadas fue eficaz para inhibir el crecimiento de un tumor MC-C establecido de 50 mm³: 17 y 25 días después del tratamiento, los tumores de los 4 ratones tratados con las DC activadas tenían un volumen de 74 ± 28 mm³ y 93 ± 57 mm³, respectivamente contra 463 ± 90 mm³ ($p < 0.01$) y 1345 ± 338 mm³ ($p < 0.02$), respectivamente de los controles ($n=6$). El tratamiento con DC activadas con extracto acelular de MC-C fue igualmente efectivo que los tratamientos clásicos, basados en la transferencia adoptiva y en el pretratamiento con células tumorales irradiadas, en la prevención del crecimiento tumoral, pero sólo el tratamiento con DC permitió inhibir el desarrollo de un tumor establecido.

711. (7396) ERRADICACIÓN DE TUMORES MAMARIOS, CARCINOMA DE COLON Y METÁSTASIS PULMONARES A TRAVÉS DE LA UTILIZACIÓN UNA VACUNA CELULAR QUE EXPRESA LAS CITOQUINAS IL-12 E IL-10. LOPEZ, MARIA VERONICA; ADRIS, SORAYA; BRAVO, ALICIA; CHERNAJOVSKY, YUTI; PODHAJECER, OSVALDO

Fundación Instituto Leloir. Buenos Aires; Bone and Joint Research Unit, University of London Sección de inmunopatología, Hospital Eva Perón, BA

En el laboratorio se demostró previamente que la preinmunización de animales con células tumorales autólogas expresando las citoquinas Th1, IL-12 y Th2, IL-10 indujeron una memoria antitumoral que les permitió rechazar el desafío con células tumorales parentales (Adris y col. *Gene Ther*, 1999; Adris y col. *Cancer Res*, 2000). Con el objeto de evocar una situación clínica, utilizamos dos modelos murinos de ratones con tumor preestablecido (LM3 de mama y CT26 de colon) que fueron vacunados con células autólogas inactivadas produciendo IL-12, IL-10 o la combinación de ambas. Las vacunas expresando una sola citoquina no mostraron efecto terapéutico mientras que las vacunas combinadas expresando IL-12 + IL-10 promovieron la sobrevida del 50-70 % de los ratones durante 5 meses. Se observó que IL-10 desempeña un papel adyuvante de IL-12 acelerando el reclutamiento de células inflamatorias al área de la vacunación. Esta observación correlacionó con un importante aumento en los niveles de expresión de las quimoquinas MIP-2 y MIP-1a al día 2 y MCP-1, IP-10 y TCA-3 al día 7 después de la administración de la vacuna. Además, se observó que sólo la vacuna combinada resultó efectiva en la eliminación de metástasis espontáneas, induciendo la movilización de linfocitos al tejido pulmonar. Los animales que recibieron la vacuna combinada fueron capaces de promover en forma sistémica ambas respuestas de tipo Th1 y Th2, mientras que en el sitio de administración de la vacuna se observó el desarrollo de una respuesta Th1. En este estudio demostramos que la combinación de vacunas expresando IL-12 e IL-10 actúan de forma sinérgica induciendo la erradicación de tumores preestablecidos y metástasis pulmonares espontáneas pudiendo tener implicancias potenciales en la terapia del cáncer.

712. (7644) LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL LIGANDO DE NKG2D MICA EN UN MELANOMA HUMANO INDUCE RETARDO DEL CRECIMIENTO TUMORAL IN VIVO MEDIADO POR CÉLULAS NK. FUERTES, MERCEDES; MOLINERO, LUCIANA; GIRART, MARÍA VICTORIA; DOMAICA, CAROLINA; GARCÍA MINUZZI, MARIANA; FAINBOIM,

LEONARDO; RABINOVICH, GABRIEL; ZWIRNER, NORBERTO

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas y Dpto. de Microbiología, Fac. de Medicina, UBA

En un individuo, los tumores atraviesan por 3 fases durante su desarrollo (inmunoedición del cáncer): 1) eliminación (vigilancia inmunológica), 2) equilibrio entre las células tumorales y el sistema inmune, y 3) escape tumoral. Las células tumorales expresan ligandos del receptor activador de citotoxicidad NKG2D, expresado por células NK, linfocitos T gd y ab CD8+, a pesar de lo cual progresan en su crecimiento. Entre estos ligandos se destaca la proteína de membrana MICA que se expresa en diversos tumores. Además, la secreción de MICA por clivaje proteolítico parece constituir un mecanismo de escape tumoral. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la sobreexpresión de MICA sobre la respuesta inmune anti-tumoral in vivo por células NK. Se clonó el cDNA de MICA en un plásmido y se produjeron transfectantes estables del melanoma humano MEL-LES (expresa muy bajos niveles endógenos de MICA y resiste la lisis por células NK). Se obtuvieron 3 clones que expresan altos niveles de MICA en superficie (1C1, 1C10 y 2A2), con los que se desafiaron ratones nude por vía sc. Como controles se emplearon el melanoma wt (LES) y un clon transfectado con plásmido control (F3). La sobrevida en días \pm DS fue: LES ($n=9$): $48,1 \pm 7,5$; F3 ($n=12$): $69,0 \pm 18,5$ (ns); 1C1 ($n=12$): $87,4 \pm 18,1$ ($p < 0,01$); 1C10 ($n=11$): $78,2 \pm 19,0$ ($p < 0,01$); 2A2 ($n=12$): $88,8 \pm 27,2$ ($p < 0,01$). Esto indica que la sobreexpresión de MICA potencia la citotoxicidad antitumoral de células NK y retarda el crecimiento de tumores in vivo. Los tumores recuperados de los animales conservaron la expresión de MICA en superficie, por lo que el clivaje proteolítico no sería un mecanismo de escape en este caso. La sobreexpresión de MICA por transfección en melanomas favorece la inmunovigilancia por células NK y retarda el crecimiento tumoral. Esta estrategia podría ser una novedosa inmunoterapia que facilita el rechazo de las células tumorales.

713. (7797) MECANISMOS INMUNES RESPONSABLES DEL RECHAZO TUMORAL DE UN LINFOMA MURINO GENÉTICAMENTE MODIFICADO PARA EXPRESAR LAS MOLÉCULAS COESTIMULADORAS DEL RCT, CD40, CD40L Y CD80. RUYBAL, PAULA; GRAVISACO, MARÍA JOSÉ; DE LUCA, PAOLA; ESCALADA, ANA; WALDNER, CLAUDIA; MONGINI, CLAUDIA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO, CONICET) CITOMED (Buenos Aires)

La activación de los LT requiere de tres señales: la presentación de antígenos del tumor por el CMH, las producidas por moléculas coestimuladoras del RCT y señales de propagación (citoquinas). El objetivo fue estudiar los mecanismos inmunes desencadenados por las células del linfoma LBC transfectadas con CD40L (LBC.40L), CD40 (LBC.40), y CD80 (LBC.80), al ser inoculadas en ratones singeneicos. Se realizaron curvas de sobrevida con lotes de 6 ratones BALB/C inoculados i.p con 10(6) células LBC, LBC.40L, LBC.40 y LBC.80. El 100% de los ratones inoculados con células LBC ó transfectadas con el plásmido Mock murieron con un TM50 de 18 días. El 75, 60 y 65% de los ratones inoculados con LBC.40L, LBC.40 ó LBC.80, respectivamente, no desarrollaron el tumor y permanecen vivos después de 9 meses post-inoculación. Los mecanismos inmunológicos involucrados se determinaron por citotoxicidad específica (CTXe), ELISPOT para IFNg, citometría de flujo y curvas de sobrevida de ratones atímicos. Demostramos la presencia de CTXe en esplenocitos de ratones que rechazaron las células LBC.40L, LBC.40 ó LBC.80, (62, 74, 20 %, respectivamente) detectándose por citometría de flujo principalmente poblaciones de LT CD8 y CD4. Se obtuvieron células secretoras de IFNg en los esplenocitos de los ratones que rechazaron a las células LBC.40L, LBC.40 ó LBC.80 [21, 46 y 8 spots/10(6)células, respectivamente, y 0 spots/10(6) para los controles negativos]. El

67% de los ratones inoculados con LBC.40L, no desarrollaron el tumor y permanecen vivos después de 9 meses post-inoculación. El 100% de los ratones NUDE inoculados con células LBC.CD40 ó LBC.80, murieron con un TM50 de 23 Y 39 días, respectivamente. Los mecanismos estudiados que participarían del rechazo de las células transfectadas con moléculas coestimuladoras serían: los LTc para LBC.CD40 y una combinación de LTc y mecanismos innatos para LBC.CD40L y LBC.CD80

714. (7969) EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE LAS MOLÉCULAS COESTIMULADORAS DEL RCT, CD40, CD40L Y CD80 EN EL RECHAZO DE UN LINFOMA MURINO. RUYBAL, PAULA; DE LUCA, PAOLA; GRAVISACO, MARÍA; BARCALA, VIRNA; WALDNER, CLAUDIA; MONGINI, CLAUDIA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO, CONICET); Citomlab (Buenos Aires)

En trabajos anteriores hemos demostrado que la transfección de las células del linfoma LBC con las moléculas coestimuladoras CD40, CD40L y CD80 resultó en un aumento significativo del TM50 y en el porcentaje de ratones sobrevivientes, con respecto a la inoculación con células sin transfectar. Sin embargo, no pudo observarse una protección al desarrollo del tumor en el 100% de los ratones estudiados. El objetivo fue determinar si el efecto antitumoral se vería sinergizado por la co-inoculación de diferentes proporciones de células tumorales transfectadas para expresar CD40L (LBC.40L), CD40 (LBC.40) y CD80 (LBC.80). Lotes de 6 ratones fueron inoculados por vía IP con 1x10⁶ células totales. Se combinaron los tres tipos de células transfectadas aportando cada una de ellas el 33,33% del total de células inoculadas y por otra parte se inocularon 2 combinaciones de células LBC transfectadas (LBC.40L+ LBC.40; LBC.40L+ LBC.80 y LBC.40+ LBC.80) en proporciones 1:3, 1:1, 3:1 en cada caso. Sólo el 100% de los ratones inoculados con la triple combinación o con células LBC.40L+LBC.80 en proporción de 50% y 25+75%, rechazaron y permanecieron libres del tumor después de 9 meses. Demostramos que el efecto protector producido por las células LBC.CD40L y LBC.CD80 pudo ser potenciado al inocular una combinación de ambas células transfectadas, sugiriendo la estimulación de diferentes mecanismos inmunes antitumorales.

715. (8002) REVERSIÓN DEL ECLIPSE INMUNOLÓGICO DE RATONES PORTADORES DE TUMOR MEDIANTE TRATAMIENTO ANTIINFLAMATORIO. RUGGIERO, RAÚL; VANZULLI, SILVIA; VERMEULEN, MÓNICA; VULCANO, MARISA; BUSTUOABAD, OSCAR DAVID

División Medicina Experimental, IIHEMA, IEO-FM, Academia Nacional de Medicina

El primer objetivo que debería plantearse todo intento de inmunoterapia clínica es el de revertir el eclipse inmunológico presente en los portadores de tumores establecidos que exceden un volumen mínimo que en el caso del tumor MC-C que hemos elegido como modelo es de 500mm³. Hemos observado que a medida que el tumor MC-C crece el bazo aumenta de tamaño y sus poblaciones celulares se modifican especialmente en el número de neutrófilos pasando de un 0% en ratones normales, 5±0.4 % en 6 ratones portadores de MC-C de menos de 500mm³ a 11± 0.5% en 6 ratones portadores de MC-C grande en estado de eclipse (p<0.001). Este cambio poblacional se reflejó en la fórmula sanguínea circulante y en las células que infiltraban los tumores MC-C de distinto tamaño. Una dosis de dexametasona (50 µg/ratón) aplicada por vía intramuscular a ratones en estado de eclipse disminuyó el número de neutrófilos circulantes y los que infiltraban el bazo a valores observados en ratones portadores de MC-C de menos de 500mm³ (período preeclipse). Esto se reflejó en una recuperación de la capacidad para inhibir implantes tumorales secundarios (inmunidad concomitante) y para transferir inmunidad a ratones naive de manera comparable a la que tienen los ratones portadores de MC-C en

el período preeclipse. La dexametasona era inoculada 3 días antes del desafío secundario o de la transferencia pasiva. Asimismo, este tratamiento pudo revertir en gran medida la inmunosupresión que persistía aún después de la extirpación del tumor. El tratamiento antiinflamatorio con dexametasona revirtió en gran parte el eclipse inmunológico de portadores de MC-C de gran tamaño, lo que se correlacionó con una disminución de los neutrófilos circulantes e infiltrantes del bazo. Esto no significa que este tratamiento sea suficiente para eliminar el tumor primario pero puede servir de base para que una inmunoterapia adicional no encuentre un organismo refractario y pueda ser eficaz.

716. (8090) SPARC PRODUCIDA POR CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO MODULA EL RECLUTAMIENTO Y LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA ANTI-TUMORAL DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES. PRADA, FEDERICO; ALVAREZ, MARIANO J.; SALVATIERRA, EDGARDO E.; BRAVO, ALICIA; LUTZKY, VIVIANA; CARBONE, CECILIA; PITOSI, FERNANDO; CHULUYAN, EDUARDO; PODHAJECER, OSVALDO

Lab. Terapia Génica-Instituto Leloir, Hospital Eva Perón, Hospital de Clínicas UBA, Fac. Vet. UNLP

SPARC es una proteína de matriz extracelular asociada con procesos de morfogénesis y remodelación de tejidos. La expresión de SPARC ha sido asociada con la progresión maligna de distintos tumores, sin embargo, su rol preciso en la progresión tumoral todavía no ha sido establecido. Trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que la disminución de la expresión de SPARC en células de melanoma indujo la pérdida de tumorigenicidad en ratones atímicos, resultado que estuvo asociado con un mayor reclutamiento de células inflamatorias al sitio de inyección de los tumores. Para estudiar el posible rol de SPARC en la respuesta inflamatoria antitumoral inhibimos la expresión de SPARC en células de melanoma humano mediante la expresión de ARN antisentido (células SP-AS). La inyección de células SP-AS en ratones atímicos indujo el reclutamiento de PMN e inhibió el crecimiento de los tumores. Las células SP-AS indujeron una mayor migración de PMN humanos (PMNh) in vitro en el 60% de donantes estudiados. Mediante el uso de anticuerpos neutralizantes e inhibidores específicos identificamos a los factores responsables del reclutamiento de los PMN. Mientras que, IL-8, Gro y leucotrienos mediaron el reclutamiento mediado de PMN in vivo y la migración de los PMNh in vitro, los factores pro-apoptóticos IL-1 y FasL estuvieron involucrados en una etapa posterior. Interesantemente, las células SP-AS indujeron la actividad citotóxica anti-tumoral de los PMNh de todos los donantes estudiados. Tanto la re-expresión transiente de SPARC en las células SP-AS como el agregado exógeno de SPARC purificada revirtió la estimulación de la actividad citotóxica de los PMN. Estos resultados muestran que SPARC producida por las células de melanoma juega un rol esencial en el reclutamiento y en la actividad citotóxica anti-tumoral de los PMN.

717. (8105) PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE TEMPRANA INDUCIDA POR UNA CEPAS VACUNAL DE SALMONELLA TYPHI ATENUADA INOCULADA POR VÍA DE MUCOSAS EN LA REGIÓN TUMORAL.. GRAVISACO, MARÍA JOSÉ; DRUKER, JIMENA; BALBOA, LUCIANA; ESCALADA, ANA; MONGINI, CLAUDIA; WALDNER, CLAUDIA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO, CONICET); CITOMED (BUENOS AIRES)

Previamente demostramos que la cepa vacunal de Salmonella Typhi atenuada (CVD915) cuando es inoculada por vía intranasal induce un claro efecto antitumoral, aumentando significativamente la sobrevida de ratones inoculados en forma subcutánea (s.c) con células del linfoma T murino, LBC. El objetivo de este trabajo fue estudiar mecanismos antitumorales inducidos por la inmunización intranasal de ratones portadores del linfoma LBC con la cepa

vacunal de Salmonella Typhi atenuada. Ratones BALB/c fueron inoculados en forma s.c con células LBC. Cuando los animales mostraron tumores palpables se les inoculó por vía intranasal 2x10(9) UFC de las bacterias o PBS. Después de 4 días, se realizaron homogenatos celulares de los tumores, los bazos, los ganglios axilares e inguinales. Se encontró un aumento significativo ($p < 0.05$) en el número de células de los ganglios de ratones inmunizados con las bacterias ya sea inoculados con el tumor o normales, respecto de los ganglios de ratones sin inmunizar, inoculados o no con el tumor. Por citometría de flujo se observó un aumento del número de LT CD4 y CD8. En los ratones portadores del tumor y tratados con las bacterias se determinó una disminución del 50% de las células tumorales y un aumento ($p < 0.05$) de los LT CD4 intratumorales, respecto de los animales sin inmunizar. Los esplenocitos de los ratones inoculados con el tumor e inmunizados con las bacterias, mostraron actividad citotóxica contra las células LBC determinada por ensayos de citotoxicidad mediada por células. La activación linfocitaria observada en los ganglios drenantes con expansión del número de LT CD8 y CD4 generada por la respuesta inmune temprana inducida por la cepa vacunal Salmonella Typhi en los ratones inmunizados por vía intranasal, conjuntamente con la actividad citotóxica antitumoral podrían contrarrestar los mecanismos inmunosupresores propios del tumor e inhibir su crecimiento.

NEUROCIENCIAS 7: NEUROQUÍMICA Y NEUROFISIOLOGÍA 7 / CELULAR Y MOLECULAR 4

718. (7074) EL AMBIENTE ENRIQUECIDO INDUCE NEUROPROTECCIÓN EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON. TORRE, LUCIANA; ANASTASÍA, AGUSTÍN; MASCÓ, DANIEL H.

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Cátedra de Biología Celular, FCFEYn, UNC

Numerosos trabajos demuestran que el ambiente enriquecido (EE) posee efecto neuroprotector en injurias que afectan diferentes regiones del SNC, como: isquemia, hipoxia, trauma, status epilepticus, entre otras. En este trabajo demostramos por primera vez que el ambiente enriquecido fue capaz de tener un remarcable efecto neuroprotector en un modelo animal de enfermedad de Parkinson. Este modelo se genera mediante la administración intracerebral de 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) en el Fascículo Longitudinal Medial (medial forebrain bundle) la cuál provoca la destrucción selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la Sustantia Nigra. Un grupo de animales ($n=10$) fueron mantenidos en un vivario con objetos estimuladores (rampas, túneles, juguetes, rueda de ejercicio, etc.) durante tres semanas anterior a la lesión. El grupo control ($n=5$) fue mantenido en condiciones estándar durante el mismo período. Posteriormente los diferentes grupos fueron lesionados y ubicados en las mismas condiciones descriptas hasta su sacrificio 21 días mas tarde. En el grupo de animales mantenidos en condiciones estándar el número de neuronas dopaminérgicas, evaluadas por inmunohistoquímica del marcador Tirosina Hidroxilasa, en el lado ipsilateral a la lesión fue del 10-12% con respecto al lado contralateral del mismo animal. Por el contrario el grupo de animales mantenidos en ambiente enriquecido mostró un notable aumento en el número de neuronas dopaminérgicas que sobrevivieron a la lesión. (35-70%, $p < 0.05$). Debido a que existen antecedentes en la literatura que la administración exógena del Factor trófico GDNF induce similar neuroprotección a la encontrada en nuestros experimentos, los resultados sugieren la posibilidad que el ambiente enriquecido induzca aumentos endógenos de GDNF y que estos modificaciones sean las responsables de la neuroprotección observada.

719. (7117) ALTERACIONES DEL HIPOCAMPO EN LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA (SHR). PIETRANERA, LUCIANA; SARAVIA, FLAVIA; ROIG, PAULINA; LIMA, ANALÍA; DE NICOLA, ALEJANDRO

IBYME, Depto. de Bioquímica Humana. Fac. de Medicina. UBA

En la rata SHR existen cambios funcionales en el cerebro que ocurren predominantemente en el hipotálamo. Nosotros demostramos, en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), aumento del ARNm de arginina vasopresina (AVP) y de la proteína Fos lo que sugiere la hiperfunción del PVN en la rata SHR. El hipocampo ejerce un tono gabaérgico inhibitorio sobre el hipotálamo, por lo que una alteración del hipocampo podría llevar a un aumento en la biosíntesis de neuropéptidos hipotálamicos. Nuestro objetivo fue investigar las posibles alteraciones en el hipocampo de SHR. Se estudiaron: a) la proliferación neuronal en el giro dentado (GD) medida por la incorporación de BrdU, b) reactividad astrocitaria GFAP positiva y Apolipoproteína E positiva, marcadora de neurodegeneración, y c) estrés oxidativo a través de la actividad de la enzima NADPH diaforasa. Los animales SHR (machos de 16 semanas de vida y francamente hipertensos) mostraron: I) disminución en la proliferación con respecto a sus controles Wistar Kyoto (WKY) (WKY: 55.56 ± 5.55 ; SHR: 31.31 ± 3.28 cels.BrdU+/hemiGD, $p < 0.01$). II) aumento del número de astrocitos GFAP positivos en todas las áreas del hipocampo (CA1: WKY: 142.85 ± 12.40 , SHR: 279.54 ± 16.97 , $p < 0.001$; CA2: WKY: 126.02 ± 9.24 , SHR: 184.30 ± 14.87 , $p < 0.05$; CA3: WKY: 118.58 ± 5.41 , SHR: 241.35 ± 20.20 , $p < 0.01$; GD: WKY: 187.35 ± 8.8 , SHR: 422.88 ± 56.09 , $p < 0.01$, astroc.+/ mm^2). III) mayor número de astrocitos ApoE positivos en todas las áreas del hipocampo (CA1: WKY: 32.42 ± 15.36 , SHR: 217.71 ± 21.37 , $p < 0.001$; CA2: WKY: 26.72 ± 12.24 , SHR: 243.30 ± 27.55 , $p < 0.001$; CA3: WKY: 20.46 ± 6.48 , SHR: 227.86 ± 41.27 , $p < 0.01$; GD: WKY: 38.27 ± 8.66 , SHR: 188.28 ± 30.40 , $p < 0.01$, astroc.+/ mm^2). IV) aumento en el área total positiva para NADPHd en CA2 (WKY: 5475.63 ± 1648.09 , SHR: $14271.33 \pm 1342.19 \mu m^2$, $p < 0.05$). Estas alteraciones hipocámpales podrían contribuir a la hiperfunción del PVN, núcleo que participa en el control cardiovascular y en la hipertensión arterial.

720. (7122) LA COMPENSACIÓN DE CANALES DE CALCIO P/Q POR N EN RATONES KNOCK OUT DISMINUYE LA PLASTICIDAD DE CORTO TÉRMINO EN EL CÁLIZ DE HELD. GONZÁLEZ INCHAUSPE, CARLOTA¹; MARTINI, FRANCISCO J.¹; FORSYTHE, IAN D.²; UCHITEL, OSVALDO D.¹

¹ Laboratorio de Fisiología y biología molecular. IFIBYNE. CONICET. FCEN. UBA. ²Dep. Cell Physiology and Pharmacology, University of Leicester. UK

Los canales de calcio tipo P/Q median la liberación de transmisores en muchas sinapsis centrales. En ratones, la eliminación de este tipo de canales induce un síndrome neurológico caracterizado por pérdida del equilibrio, ataxia y muerte prematura. Hemos estudiado la transmisión sináptica entre los terminales presinápticos Caliz de Held y el soma de las neuronas postsinápticas del núcleo medio del cuerpo trapezoidal (MNTB) que forma parte del sistema auditivo. Mediante la técnica de "whole cell patch clamp" se estudiaron las corrientes presinápticas (Ica) y corrientes postsinápticas evocadas por la liberación de glutamato (EPSCs), en ratones normales (WT) y knock out (KO). Demostramos que los canales tipo N compensan funcionalmente la ausencia de canales P/Q en el caliz de Held de ratones KO, no así en el soma de las neuronas del MNTB. La densidad de Ica y las EPSCs muestran una reducción de aproximadamente un 30% en KO respecto de WT. Las curvas corriente-voltaje (I-V) y las curvas de activación están desplazadas aproximadamente 5mV hacia potenciales positivos. Pero la mayor diferencia funcional es la disminución en ratones KO de la facilitación. Frente a un par de pulsos de potencial depolarizante (de -70mV a -10mV, 2ms, separados por 10ms), la corriente presináptica generada por el segundo pulso se ve aumentada en ratones WT, pero no en los KO. Lo mismo sucede con las EPSCs evocadas por dos estímulos sucesivos con un intervalo de 10ms: la facilitación se ve altamente disminuida en los KO respecto de los WT. Si bien la

compensación de canales tipo P/Q por N posibilita el funcionamiento de la transmisión sináptica, fenómenos de plasticidad de corto término mediados por la modulación calcio-dependiente de los canales presinápticos resultan alterados. Esto sugiere que uno de los roles fisiológicos de los canales P/Q es proveer un mecanismo de facilitación que contribuye a mantener una transmisión sináptica rápida.

721. (7232) VULNERABILIDAD NEURONAL Y ASTROCITARIA EN RATAS ADULTAS ESTRESADAS PRENATALMENTE. BARROS, VIRGINIA G.(1); DUHALDE-VEGA, MAITE (2); CALTANA, LAURA (2); BRUSCO, ALICIA (2); ANTONELLI, MARTA C.(1)

(1) IQUIFIB. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Buenos Aires. (2) IBCyN. Facultad de Medicina, UBA. Buenos Aires.

Durante el periodo prenatal se originan y diferencian neuronas y células gliales. Los insultos sufridos en ese periodo pueden alterar tanto la morfología neuronal como afectar a los astrocitos responsables de regular la supervivencia neuronal. En nuestro laboratorio habíamos demostrado que el estrés prenatal por inmovilización realizado durante la última semana de gestación de la cría aumenta los niveles de receptores glutamatérgicos en la cría adulta. Empleando el mismo modelo de estrés prenatal, estudiamos la morfología astrocitaria y el grado de arborización dendrítica en el cerebro de la rata adulta. En el día postnatal 90, los cerebros de la cría adulta fueron procesados por inmunocitoquímica para detectar: GFAP (proteína gliofibrilar ácida, específica del citoesqueleto astrocitario); S-100 (proteína astrocitaria citosólica que se postula como factor neurotrófico) y MAP-2 (proteína asociada a microtúbulos presente predominantemente en dendritas). Se realizó el estudio morfométrico en la matriz estriatal, corteza frontal y área CA1 de hipocampo, utilizando el sistema de análisis de imágenes (VIDAS-Kontron) asociado a un fotomicroscopio Zeiss, sobre: área de astrocitos GFAP+, áreas relativas cubiertas por prolongaciones MAP-2+, densidad óptica relativa del citoplasma de astrocitos S-100+. Se observó aumento significativo del área de los astrocitos (hipertrofia astrogial) con aumento de inmunotinción para S-100 y disminución del área cubierta por dendritas MAP-2+. Estos resultados demuestran que el insulto recibido durante la gestación provoca alteraciones en el sistema nervioso que persisten hasta la vida adulta. Se postula que los astrocitos reactivos estarían disminuyendo la disponibilidad extracelular de S-100, lo que sumado a la alteración de la neurotransmisión glutamatérgica podrían llevar a una despolimerización de la MAP-2 con la subsecuente disminución del área dendrítica. Realizado con subsidio UBACYT (AB) M-072 y CONICET, PIP 6266 (MA).

722. (7272) ALTERACIONES DEL SISTEMA NITRERGICO EN LA MEDULA ESPINAL DE RATAS SOMETIDAS A ASFIXIA PERINATAL. DORFMAN, VERÓNICA B.; BAYONA, JULIO CÉSAR; REY FUNES, MANUEL; HUARTE, MARÍA; COIRINI, HÉCTOR; LOIDL, C. FABIÁN

IBCyN "Prof. E. De Robertis"; IByME, Dept. Bioquímica Humana, Fac. Medicina, UBA,

La asfixia perinatal (AP) produce altos niveles de óxido nítrico (NO) en el SNC. Esto podría ser una de las causantes de parálisis o espasticidad cerebroespinal. El exceso de NO producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), provoca nitrosilación proteica e inicio de la cascada apoptótica. Con el objetivo de estudiar la región medular que inerva las extremidades anteriores analizamos mediante inmunohistoquímica las isoformas de NOS neuronal (nNOS) e inducible (iNOS), y de proteínas nitrosiladas en ratas Sprague-Dawley adultas, sometidas a un modelo de AP. Hemos encontrado que, en grupo AP (n=5) y control (CTL; n=5), ambas isoformas de NOS se localizan en la médula espinal cervical; la nNOS sólo en lámina X, mientras que la iNOS está distribuida en todas las láminas. En el grupo AP, se observó una disminución en el número de motoneuronas iNOS(+) (CTL=12±2 vs AP=8±1,

p<0,05). En las neuronas nNOS(+) de la lámina X, el grupo AP presentó disminución del área inmunorreactiva con respecto al grupo CTL (CTL=115±23 vs AP=112±16, p<0,05). Paradójicamente, en el grupo AP detectamos un aumento en el número de motoneuronas inmunorreactivas para nitrotirosina (N-Tyr) (CTL=4±2 vs AP=10±3, p<0,05). Se evaluó además la capacidad prensil y tono muscular de los miembros anteriores, cronometrando el tiempo de sostén espontáneo al pender de un enrejado. Se determinó una disminución significativa del 20% en el tiempo de sostén en el grupo AP comparado con el CTL. La AP, induciría una mayor actividad enzimática generando un aumento de neuronas nitrosiladas, a pesar de disminuir el número de motoneuronas NOS(+). Estos cambios, que se evidencian a largo plazo en las motoneuronas que inervan las extremidades anteriores, podrían estar relacionados con el acortamiento del lapso en que los animales se sostienen. Estos hallazgos permitirían entonces, incluir al NO dentro de los desencadenantes de la fisiopatología de la espasticidad. (UBACYT - M020).

723. (7304) PARTICIPACION DEL RECEPTOR A LA NEUROTENSINA (NTS1) EN EL INCREMENTO DEL RECAMBIO DE FOSFOINOSITIDOS POR LA OUABAINA. PEREYRA-ALFONSO, SUSANA; ARMANINO, MARÍA; VÁZQUEZ, CAROLINA; WILLIAMS, LETICIA; RODRÍGUEZ DE LORES A, GEORGINA

Instituto De Biología Celular Y Neurociencias «Prof. E. De Robertis», Facultad De Medicina, UBA. Catedra De Farmacología, Facultad De Farmacia Y Bioquímica, Universidad De Buenos Aires.

La hidrólisis de fosfoinosítidos (PI) en cerebro de ratas neonatas, aumenta por la acción de diversos neurotransmisores, neuromoduladores y por la ouabaína, inhibidor de la bomba de Na(+). En nuestro laboratorio, se demostró que el neuropéptido neurotensina (NT) inhibe la actividad de dicha bomba, efecto bloqueado por el SR 48692, un antagonista específico para el receptor de alta afinidad a la NT (NTS1). El objetivo de este trabajo fue evaluar el papel del receptor NTS1 en el aumento del metabolismo de PI por la inhibición de la bomba de Na(+). Se incubaron miniprismas de corteza cerebral de ratas Wistar neonatas con (3)H-mioinositol en un buffer Krebs-Henseleit durante 60 min. Luego, los prismas se incubaron en presencia de SR 48692 (10(-4)M) más ouabaína (10(-4)M) durante 20 o 60 min más. En otra serie de experimentos, los prismas se preincubaron 30 min en ausencia o presencia de SR 48692, se agregó ouabaína y se continuó la incubación durante 20 o 60 min más. Luego de la extracción en cloroformo/metanol (1:2 v/v), en la fase acuosa se cuantificó el (3)H-inositol-fosfato. La acumulación de (3)H-inositol-fosfato por ouabaína con respecto al basal fue de 299±22.2% y de 497±61.7%, luego de 20 y 60 min de incubación, respectivamente; en presencia de SR 48692 estos valores disminuyeron a 223±2.7% (25%) y 250±35.4% (50%). Luego de la preincubación con SR 48692 durante 30 min, la acumulación de (3)H-inositol-fosfato por ouabaína respecto del basal fue de 411±9.6% y 861±67.5%, valores que disminuyeron a 279.0±8.7% (32%) y 413.7±129.6 (52%), durante 20 y 60 min, respectivamente (n=3-7; P<0.05). Los resultados muestran que el SR 48692 disminuye el incremento de la hidrólisis de PI producido por la ouabaína, efecto mayor a tiempo más prolongado de incubación (60 min) e independiente de la preincubación con el antagonista. Se sugiere la participación del receptor NTS1 en dicho fenómeno de señalización celular mediado por la bomba de sodio.

724. (7352) CARACTERIZACIÓN DEL VENENO DE MICRURUS PYRRHOCRYPTUS: ASPECTOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES. DOKMETJIAN, JOSÉ CHRISTIAN; DEL CANTO, SERGIO (1); BISCOGLIO, MIRTHA (1)

ANLIS-INPB «Dr. C. G. Malbrán», Av. Velez Sarsfield 563 (1281) Buenos Aires, Argentina. (1) Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA, Junín 956 (1113) Buenos Aires, Argentina.

Las serpientes de Coral son los únicos elápidos en América; existen tres géneros y alrededor de 120 especies y subespecies. *Micrurus* es el género más representativo en cuanto a diversidad y abundancia, y se lo encuentra desde América del Norte hasta el sur de la República Argentina. Las personas mordidas pueden llegar a la muerte debido a parálisis muscular seguida de paro respiratorio, como consecuencia del bloqueo de receptores nicotínicos. En este trabajo estudiamos aspectos estructurales y funcionales del veneno de *Micrurus pyrrochryptus*. La dosis letal 50 (DL50) es de 1,1 µg/g de ratón. El veneno no presenta actividad hemorrágica ni necrótica. La actividad coagulante es de 6,25 µg y posee intensa actividad hemolítica indirecta. El SDS-PAGE muestra la complejidad del veneno con bandas proteicas en el rango de 6 a 36 kDa. La filtración molecular (Superdex G75) permitió obtener cinco fracciones principales las cuales fueron analizadas por espectrometría de masa. Los resultados obtenidos indican la presencia de al menos 100 especies moleculares; se confirma la presencia de polipéptidos característicos de estos venenos tales como fosfolipasas y neurotoxinas cortas y largas. Se determinó la actividad fosfolipásica y ensayos de DOT confirmaron la presencia de neurotoxinas postsinápticas con capacidad de unirse al receptor nicotínico muscular. La mezcla de proteínas contenida en cada fracción proveniente de filtración molecular se resolvió por RP-HPLC, se determinó la secuencia N-terminal de las fracciones purificadas; los datos obtenidos se compararon con los existentes en bases de datos de secuencia. Se identificaron y estudiaron aspectos estructurales de fosfolipasas y neurotoxinas del veneno de *Micrurus pyrrochryptus*. La información obtenida es relevante para alcanzar los objetivos: a) generar una mezcla de proteínas recombinantes con el fin de obtener un antiveneno de calidad reproducible y con alta capacidad neutralizante; b) obtener nuevas herramientas para el estudio de receptores nicotínicos.

725. (7393) DESPLAZAMIENTO DE E1, UNA ENZIMA CLAVE DEL PATHWAY PROTEOLÍTICO DE LA UBIQUITINA, HACIA LOS ONF EN CEREBROS DE PACIENTES CON ALZHEIMER FRANCO, PAULA; LÓPEZ SALON, MARIELLA; CASTAÑO, EDUARDO; SOTO, EDUARDO; PASQUINI, JUANA

Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires, Argentina

En la enfermedad de Alzheimer (EA), los ovillos neurofibrilares (ONF) y las placas seniles, presentes en el cerebro, son rasgos neuropatológicos característicos. Los ONF se acumulan dentro de las neuronas y están compuestos de agregados filamentosos de la proteína asociada a microtúbulos tau (FHP). Las inclusiones intraneuronales contienen depósitos de proteínas ubiquitinizadas, indicando perturbaciones en la proteólisis dependiente de ubiquitina (Ub). Hemos demostrado previamente que en cerebros de pacientes con EA la ubiquitinización es anormal debido a una disminución en la actividad de E1 (enzima activadora de la Ub) en el citosol de la neurona, como consecuencia de su deslocalización hacia la fracción particulada o de membranas (López Salon 2000). Utilizando un anticuerpo contra PHF, detectamos por inmunohistoquímica un gran número de ONF y placas amiloides en cerebros de pacientes con EA y un anticuerpo anti E1 reveló la presencia de esta enzima en los ONF. Para corroborar estos resultados estudiamos el patrón de solubilización de E1 en diferentes fracciones aisladas por centrifugación diferencial. En la EA, el 60% de la E1 se obtiene en la fracción particulada, mientras que en muestras control la enzima E1 está principalmente localizada en el sobrenadante celular. La deslocalización de la E1 hacia los ONF podría ser un evento tardío de la EA. Al producirse una disminución de la actividad de E1 en el citosol, probablemente se facilite la acumulación anormal de proteínas, sugiriendo un posible papel de este mecanismo en la progresión de la enfermedad.

726. (7464) RELACION ENTRE EL APRENDIZAJE, LA PERCEPCION DOLOROSA Y LOS RECEPTORES MUSCARINICOS EN EL PERIODO POSTNATAL EN LA RATA.

BLANCO, C.; SNITCOFSKY, M.; CHELI, V.; MARTIN, E.; RIVERO, J.E.; JERUSALINSKY, D.

A. Anatomía. Fac. Cs. Veterinarias. UBA. Instituto de Biología Celular. "Dr. E. De Robertis". Fac. Medicina. UBA.

Ansiedad y temor son respuestas a peligros potenciales y/o reales. Se caracterizan por modificaciones fisiológicas (PA, FC, etc.) y por modificaciones de parámetros conductuales: inhibición del aprendizaje, exploración, evitamiento (Belzung, 2001). Durante el desarrollo postnatal, ratas Wistar de distintos grupos etarios mostraron diferencias en el aprendizaje de una tarea de evitamiento inhibitorio (EI) de un choque eléctrico en las patas. La escopolamina, antagonista muscarínico, administrada i.p. en animales de 22 días, tuvo un efecto sobre el aprendizaje diferente al del adulto, resultando facilitatoria. Con el objetivo de analizar la posible interferencia de la percepción/transmisión nociceptiva en estos resultados, estudiamos la maduración de la percepción dolorosa y el efecto de la escopolamina sobre la misma. Trabajamos con ratas Wistar de 22, 32 y 42 días de edad en una prueba de "tail-flick" (reflejo de retiro de la cola), utilizando un baño termostático. Para todas las edades trabajamos con dos grupos: uno control, que recibió una inyección de salina i.p., y otro que fue tratado con escopolamina en la misma dosis de 0,5 mg/kg i.p. (Zdenek y col, 1998), que resultó facilitatoria en la prueba de EI. Registramos la latencia de los animales para retirar completamente su cola del agua mantenida a 51° C ± 1C. Observamos un aumento significativo en las latencias, correlacionado con la edad (p<0,05). Por otro lado, los grupos tratados con salina y con escopolamina no mostraron diferencias significativas entre sí (p>0,05) en las edades estudiadas. Sin embargo, ambos grupos mostraron una disminución en la latencia respecto de los animales sin tratamiento. Si bien la sensibilidad dolorosa parece disminuir con la edad, la escopolamina, en la dosis utilizada y en las edades ensayadas, no afectó dicha percepción/transmisión, por lo que el efecto facilitatorio sobre el aprendizaje resultaría independiente de los fenómenos nociceptivos involucrados

727. (7480) ROL DUAL DE LA EXPRESIÓN CRÓNICA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF) EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. CHERTOFF, M; DI PAOLO, N; FERRARI, C; EISEL, U; PITOSI, F

Laboratorio de Neuroinmunomodulación y Terapia Génica-Fundación Instituto Leloir – CONICET-UBA-Arg, Universidad de Groningen, Holanda.

El TNF es una citoquina proinflamatoria que ha sido relacionada con patologías en el sistema nervioso central (SNC) entre las que se encuentra la enfermedad de Parkinson (EP). En la EP se produce una progresiva degeneración neuronal en el circuito dopaminérgico nigro-estriatal. En pacientes se ha observado un aumento en los niveles de TNF y otras citoquinas sin conocerse la relación con el inicio o la progresión de la enfermedad. El objetivo de este trabajo es conocer los efectos de un estímulo inflamatorio crónico como TNF sobre la vida de las neuronas de la sustancia nigra (sn) así como también sobre la respuesta tisular del SNC. Mediante un sistema que combina ratones knock-in, vectores adenovirales recombinantes y el sistema CRE/loxP se ha logrado obtener animales con dos niveles de expresión de TNF específicamente en la sn: basal (4.1 veces por encima de los ratones no transgénicos, medido por PCR en tiempo real) y sobre-expresado (7.3 veces por encima de los que poseen expresión basal). La expresión basal crónica de TNF fue neuroprotectiva frente a la inyección intraestriatal de la neurotoxina 6-hidroxidopamina, observándose 3 veces más neuronas en animales k-in con respecto a los wt 21 días post-tratamiento. La sobre-expresión crónica de TNF produce una pérdida neuronal progresiva y una respuesta inflamatoria prolongada, con presencia de macrófagos y linfocitos. Mediante un mismo modelo demostramos que la presencia crónica de TNF a distintos niveles en la sn puede producir resultados antagonistas a nivel neuronal, por lo cual es importante conocer su mecanis-

mo de acción para poder identificar moléculas claves mediadoras de cada efecto.

728. (7486) LA PROLIFERACIÓN CELULAR SE ENCUENTRA SEVERAMENTE DISMINUIDA EN EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO DE RATONES NO OBESOS CON DIABETES ESPONTÁNEA (NOD). SARAVIA, FLAVIA; BEAUQUIS, JUAN; LEHUEN, AGNES; ROIG, PAULINA; COULAUD, JOSIANE; HOMO-DELARCHE, FRANCOISE; DE NICOLA, ALEJANDRO

IBYME, Dpto de Bioquímica Humana, Fac de Medicina, UBA e INSERM U561, CNRS 7059, Paris, Francia

La diabetes mellitus tipo 1 (T1D) es una enfermedad metabólica que se acompaña de numerosas alteraciones cerebrales, tanto en modelos animales como en pacientes. Si bien son varias las estructuras afectadas, el hipocampo -ligado a procesos de aprendizaje y memoria- parece ser una de las más severamente comprometidas. Recientemente demostramos que la neurogénesis, la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto, se encuentra muy reducida en ratones diabéticos por estreptozotocina, modelo farmacológico de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad neurogénica del giro dentado en un modelo de diabetes mellitus tipo 1 espontáneo, el ratón NOD, donde previamente habíamos descrito otras alteraciones tales como astrogliosis hipocampal e hiperexpresión de hormonas hipotalámicas. Los resultados muestran que en este modelo, en la hembra, la proliferación celular, medida como incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU, 80 mg/kg peso, ip) luego de 2 horas de administrada, es significativamente menor que en la cepa control C57Bl/6. En consonancia a lo que ocurre con la astrocitosis, los cambios de la neurogénesis se observaron tanto en el período prediabético: C57Bl/6 2780 ± 160.4 vs NOD 714 ± 64.9 células BrdU positivas/2400 μm^2 de hipocampo mapeado ($p < 0.0001$, 5 sem de vida, $n = 4-5$ en cada grupo), 1970 ± 176 vs 482.7 ± 70.5 ($p < 0.001$, 8 sem de vida) como durante la fase clínica de la enfermedad, donde los diabéticos muestran marcada hiperglicemia: 1391 ± 44.8 vs 311.7 ± 67.3 ($p < 0.0001$, 10 sem). Los datos resultan relevantes por las implicancias de la reducción en la neurogénesis hipocampal con las alteraciones cognitivas y la depresión, enfermedades de alta incidencia en pacientes diabéticos.

729. (7522) MECANISMOS DE REGULACIÓN INTRACELULAR IMPLICADOS EN LA INHIBICIÓN PRESINÁPTICA MEDIADA POR ATP EN SINAPSI NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO. DE LORENZO, SILVANA; VEGGETTI, MARIELA; MUCHNIK, SALOMÓN; LOSAVIO, ADRIANA

Instituto de Investigaciones Medicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA.

Hemos demostrado que en sinapsis neuromuscular de mamífero, la activación de los receptores (R) A1 de adenosina (AD) induce inhibición presináptica (IP) de la liberación espontánea de acetilcolina al modular los canales de calcio voltaje dependientes (CCVD) tipo L, a través de la activación de Ca^{2+} -Calmodulina. Luego, comprobamos que ATP, además de su rol como precursor de AD, tiene un efecto directo e independiente sobre la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPP) al activar sus propios R metabotrópicos P2Y, ya que induce una IP de aproximadamente 45%. Con el objeto de investigar si las vías de señalización PKA-AMPc y/o Fosfolipasa C-PKC se relacionan con la modulación mediada por ATP sobre la secreción espontánea de acetilcolina, hemidiafragmas de ratones CF1 fueron expuestos a KT5720 y a Chelerythrine, inhibidores selectivos de PKA y PKC, respectivamente. KT5720 no modificó fMEPP con respecto al control ($101.9 \pm 3.0\%$ $n = 5$) ni logró ocluir la IP inducida por ImidoATP (análogo no hidrolizable del ATP; $61.7 \pm 2.9\%$ del control $n = 5$). La Chelerythrine no modificó la fMEPP ($92.4 \pm 3.7\%$ $n = 5$) pero no permitió la acción inhibitoria del análogo de ATP ($102.3 \pm 3.5\%$ $n = 5$). Por otro lado, para evaluar

si el ATP al igual que la AD, utiliza la vía de señalización intracelular vinculada con Ca^{2+} - Calmodulina, incubamos las preparaciones con W-7, (antagonista de Calmodulina), observándose que W7 no modifica la fMEPP ($96.2 \pm 2.4\%$ $n = 4$), pero previene la IP inducida por ImidoATP ($99.9 \pm 5.4\%$ $n = 4$). En unión neuromuscular de mamífero, el ATP al activar sus R presinápticos P2Y inhibe la liberación espontánea de ACh mediante la activación de las vías intracelulares de señalización vinculadas con PKC y Calmodulina.

730. (7859) ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA DESAFERENTACIÓN RETINAL Y DE LA DEPRIVACIÓN VISUAL SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE VITAMINA D EN EL TECTUM ÓPTICO. DÍAZ DE BARBOZA, GABRIELA (1); RODRÍGUEZ, VALERIA (1); BELTRAMINO, CARLOS (2); TOLOSA DE TALAMONI, NORI (1)

Lab «Dr. Cañas» Fac. de Cs. Médicas. UNC, (2) Instituto Ferreyra

La forma hormonal de la vitamina D, el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, actúa mediante su unión a un receptor nuclear específico (VDR), factor de transcripción modulador de la expresión de ciertos genes. Sin embargo, su rol en el cerebro permanece aún sin dilucidarse. En un trabajo previo se demostró la presencia de VDR en el sistema visual del pollo. En este trabajo, nos propusimos estudiar en forma cuantitativa, el efecto de la desafferentación retinal y de la privación visual sobre la expresión de VDR en el tectum óptico (TO). Pollos Cobb Harding se sometieron a ablación retinal monocular o a privación visual monocular. A los 7 y 15 días post-intervención, se fijaron los tejidos cerebrales mediante perfusión aórtica. La detección inmunocitoquímica de VDR se realizó sobre secciones tisulares usando anticuerpo monoclonal anti-VDR 9A7. La determinación de las densidades ópticas relativas de la inmunotinción de VDR en TO ipsi y contralateral a la ablación u oclusión se realizó sobre imágenes digitales. Los resultados mostraron aumento en la expresión de VDR en las capas superficiales y profundas del TO contralateral a la ablación retinal a los 7 días post-ablación, en comparación con la del TO ipsilateral, empleado como control. El aumento desapareció a los 15 días post-ablación. La privación visual no produjo cambios en la tinción de VDR en ninguno de los tiempos estudiados. Estos resultados demuestran que la expresión de VDR en TO no depende de la llegada del estímulo visual, sino que está controlada por otros factores. El aumento en la inmunotinción de VDR en TO contralateral a los 7 post-ablación, sería la reacción del tejido ante la desafferentación para incrementar el efecto del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ destinado quizá a producir neurotrofinas con el fin de preservar la viabilidad de las neuronas tectales o de estimular las defensas antioxidantes.

731. (7931) SPHINGOLIPID AND NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR TRAFFICKING IN CHO CELLS. BAIER, CARLOS JAVIER; BARRANTES, FRANCISCO J.

INIBIBB y Cátedra UNESCO de Biofísica y Neurobiología Molecular. Bahía Blanca.

The effect of sphingolipid (SL) modification on nicotinic receptor (AChR) assembly and trafficking to the cell surface was studied in CHO cells using quantitative fluorescence microscopy in combination with selective inhibition of SL biosynthetic steps. AChR labeling at the plasma membrane diminished by 60-70% upon inducing depression of serine-palmitoyltransferase enzymatic activity in the temperature-sensitive mutant cell line CHO-SPB1/SPH(-). Similarly, step-wise inhibition of SL biosynthetic enzymes in a control AChR-expressing cell line, CHO-K1/A5, mimicked the effects observed in the SL(-)defective cell SPB-1/SPH(-). In addition, inhibition of serine palmitoyltransferase by myriocin, blockage of ceramide and complex SL biosynthesis by Fumonisin B-1, or inhibition of glucosylceramide synthase by PDMP reduced (~30-40%) cell-surface AChR. Concomitantly, intracellular receptor increased (~40-50%) in

treated cells. Such altered ratio of surface/intracellular AChR could be reversed by application of a low concentration of exogenous sphingomyelin. Since the agonist Carb binds alpha-epsilon or alpha-delta AChR dimers and complete AChR monomer, but not isolated alpha subunits, whereas bugartoxin binds all combinations of alpha, this property was exploited to learn whether SL inhibition affected AChR assembly. Indeed, unassembled AChR level increased by 30-40% in cells with inhibited SL biosynthesis, but did not change when cells were coincubated with sphingomyelin. Calnexin, a chaperone protein involved in AChR biogenesis, did not diminish in cells with impaired SL biosynthesis. Two endoplasmic reticulum markers, ER-tracker and calnexin, colocalized with AChR. Recovery experiments further identified sphingomyelin and/or complex glycosphingolipids, the final products of the SL biosynthetic pathway, as the SL involved. Taken together, these observations indicate that AChR assembly and trafficking are affected, but not biosynthesis itself, in SL-deprived cells.

NEUROCIENCIAS 8: NEUROQUÍMICA Y NEUROFISIOLOGÍA 8 / CELULAR Y MOLECULAR 5

732. (7178) LA ENDOTELINA 3 MODULA LA CAPTACIÓN NEURONAL DE NORADRENALINA EN EL HIPOTÁLAMO ANTERIOR Y POSTERIOR A TRAVÉS DE DIFERENTES VÍAS INTRACELULARES. HOPE, SANDRA; DI NUNZIO, ANDREA; SANTELLA, GISELA; BIANCIOTTI, LILIANA (1); VATTA, MARCELO

Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA. (1) Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA

La captación neuronal de noradrenalina (NA) constituye el mecanismo más importante de regulación de la concentración de la amina en el espacio sináptico, y es responsable de la terminación de la acción del transmisor. En trabajos previos demostramos que la endotelina-3 (ET3) incrementa la captación neuronal de NA en el hipotálamo anterior (HA) (32%) y la disminuye en el posterior (HP) (39%). En ambos casos sus efectos son mediados por receptores atípicos. En base a estos antecedentes se investigó los mensajeros intracelulares involucrados en estos efectos. Los estudios se realizaron en HA y HP de ratas Sprague Dawley macho (250-300 g). La captación neuronal de NA se determinó in vitro durante 5 min. (Vatta y col. Regul. Pept. 65,175,1996) en presencia o ausencia de ET3 y los inhibidores de diferentes intermediarios intracelulares. Los resultados se expresan como $\% \pm ES$ (ANOVA y t test mod. Bonferroni; * $p < 0.05$ y $n: 5-8$). En el HA el incremento de la captación de NA producido por la ET3 10nM no se bloqueó en presencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS), L-NAME 10 μ M (91.7 \pm 6.2 vs 133.0 \pm 11.1*) y tampoco de la PKA, H-89 500nM (96.7 \pm 14.4 vs 132.2 \pm 5.8*). Por su parte el inhibidor de la PLC, U73122 10 μ M, inhibió el incremento producido por la ET3 10nM (95.9 \pm 5.8 vs 90.8 \pm 6.9). En el HP la disminución de la captación inducida por la ET3 10nM se bloqueó tanto en presencia del L-NAME y 7NI (inhibidores de la NOS general y de la isoforma neuronal, respectivamente) (107.4 \pm 8.7 vs 98.1 \pm 16.3 o 101.4 \pm 5.6 vs 103.8 \pm 9.5, respectivamente) como del U73122 (90.2 \pm 17.7 vs 95.6 \pm 5.3). Por otra parte, el H89 no modificó la disminución de la captación producida por la ET3 (108.5 \pm 9.6 vs 76.9 \pm 5.5*). Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el incremento de la captación neuronal de NA producido por la ET3 en el HA es modulado por la PLC. En el HP la disminución de la captación de NA es mediada por la vía del óxido nítrico y la PLC.

733. (7398) MAPEO HISTOLÓGICO DE LECTINAS EN EL HIPOCAMPO DE RATAS ADULTAS LUEGO DE ENTRENAMIENTO DE APRENDIZAJE INHIBITORIO. HIDALGO, A; BURGOS, V; VIOLA*, H; MEDINA*, J; ARGIBAY, P

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental. Hospital Italiano BsAs. *Instituto de Biología y Neurociencias Profesor Dr E de Robertis, Facultad de Medicina UBA

En investigaciones conductuales previas no relacionadas directamente con la memoria, hemos observado cambios en la expresión de azúcares en el hipocampo de ratas adultas a través de citoquímica con lectinas. Estos resultados son compatibles con otros estudios de glicobiología y podrían ser extrapolados a experimentos de entrenamiento de aprendizaje inhibitorio (EAI). Objetivo: Estudiar la distribución de azúcares en el hipocampo de ratas adultas sometidas a EAI. Métodos: Se utilizaron 27 ratas machos Wistar las cuales fueron divididas en tres grupos de 9 animales cada uno: 1) animales entrenados en un dispositivo para aprendizaje inhibitorio. 2) animales no entrenados pero colocados dentro del dispositivo. 3) animales control no expuestos al dispositivo. A las 6 horas los animales fueron sacrificados, se extrajo y fijó el cerebro y se realizó lectina-histoquímica específica para: VVL (α/β NacGal terminal), GNL (Man α 1,3 terminal), PNA (Gal β 1,3NacGal), ECA (Gal β 1,4NacGlu), WGA (NacGlc terminal c/sSA), sWGA (NacGlc terminal sin SA), GSL II (α/β -NacGlc terminal), LTL (α -1,2fuc), AAL (fuc α 1,6 N-AcGLU) (fuc α 1,3NacLAC). Resultados: No se observaron diferencias cuantitativas ni en la distribución de las expresiones de los azúcares estudiados: La capa alveolar del hipocampo fue positiva para VVL, LTL y PNA. El citoplasma de las células granulares y células piramidales de todo el hipocampo fueron positivos para GNL mientras que se observó marcación positiva alrededor de algunas células piramidales para VVL y PNA. El neuropilo del stratum lacunosum fue positivo para LTL. El neuropilo de la capa de células polimórficas del giro dentado fue positivo para PNA mientras que su parte subgranular fue positivo para LTL. WGA fue positivo en todo el neuropilo hipocámpal. En el presente modelo conductual no se evidencian cambios de expresión de azúcares en el hipocampo. Si se debe a la no participación funcional de dichos azúcares o a la poca latencia entre entrenamiento y sacrificio deberá ser elucidado en futuros experimentos.

734. (7501) UN ANTAGONISTA DE RECEPTORES ENDOTELI-NÉRGICOS BLOQUEA EL EDEMA Y LA EXTRAVASACIÓN CELULAR EN LA UVEITIS. IRIBARNE, MARÍA; TORBIDONI, VANESA; SUBURO, ANGELA M.

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Austral.

La uveitis inducida por endotoxina se manifiesta por adhesión y extravasación leucocitaria y filtración intrarretiniana de proteínas que reflejan el daño de la barrera endotelial. Este depende a su vez de la lesión endotelial y de la respuesta glial. Hemos demostrado previamente que los astrocitos expresan fuertemente endotelina-1 (ET-1), un potente vasoconstrictor liberado durante el shock y la sepsis que puede modular el aumento inflamatorio de la permeabilidad microvascular. Para evaluar el control endotelinérgico de la permeabilidad vascular en la retina se estudió el efecto de tesozentan, un bloqueante mixto de los receptores ET-A y ET-B, sobre el desarrollo de uveitis en ratones BALB-C. Los animales ($n = 28$) recibieron una dosis sc de salina (S) o tesozentan (T, 10 mg/kg) y una hora después, una inyección ip de LPS (5 mg/kg) o salina. El tratamiento con tesozentan se repitió a las 24 horas. Una hora después, los cuatro grupos experimentales (S-S, S-LPS, T-S, T-LPS) recibieron una inyección iv de Azul de Evans (2%). Los ratones fueron sacrificados a los 20 min, y sus ojos fueron inmediatamente fijados. En las retinas de los grupos S-S y T-S, el colorante fue retenido en la luz vascular. Por el contrario, en las retinas S-LPS había extensa filtración de Azul de Evans alrededor de la papila del nervio óptico y aparecían focos de extravasación celular y filtración de colorante en las vénulas y vénulas postcapilares del plexo interno de la retina. No se observó filtración a nivel del plexo externo. En los ratones T-LPS el edema de la papila y los focos de extravasación estaban significativamente reducidos. Los re-

sultados sugieren que ET-1 participa en el control de la barrera hémato-retiniana. Se requieren otros estudios para determinar si el efecto protector se debe a modificaciones del transporte paracelular endotelial o a modificaciones en la síntesis de mediadores inflamatorios, como el TNF-alfa, en los astrocitos.

735. (7530) AJUSTE SINÁPTICO DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES NMDA EN CUERPO ESTRIADO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL. FOSSATI, MARIANA; AZCURRA, JULIO MARCOS

Laboratorio de Biología Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Durante el desarrollo postnatal de la rata, la inducción fisiológica de actividad motora mediante un test de entrenamiento circular (TEC) ha permitido definir un período crítico de maduración del núcleo estriado (caudado-putamen en humanos) durante los días postnatales 30-37 (PN 30-37). Estudios comparativos permiten asimilar este período de la rata (4-5 semanas PN) a los 3-5 años de vida del humano. Hemos demostrado que la actividad motora en dicho período induce una reducción permanente (vida adulta) del 35% en el número de receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR) y del 40% en los receptores dopaminérgicos subtipo D2 (D2R) en membrana sináptica, sin modificación del número de receptores dopaminérgicos D1 (D1R) o glutamatérgicos (NMDA). Recientemente, mediante RT-PCR, se ha demostrado que estas variaciones se hallan correlacionadas con una disminución de la expresión del mRNA de los subtipos M1, M2 y M4 del mAChR y del D2R de un 50%, sin modificación en la expresión del D1R. Además se demostró que la estimulación motora realizada durante el período crítico estriatal (PN 30-37) no modifica la expresión del mRNA de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del NMDA. Ya que los receptores NMDA están presentes en todas las neuronas estriatales, estas sinapsis están excluidas del ajuste dependiente de actividad durante este período crítico. Dado que las fibras glutamatérgicas representan la aferencia cortical primaria que ingresa al cuerpo estriado (vía motora extrapiramidal) y poseen una maduración de actividad funcional previa a las fibras colinérgicas y dopaminérgicas, en este nuevo estudio se realizó el TEC durante los días PN 20-27. Los resultados muestran una reducción de un 40% de la expresión del mRNA de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del NMDA mediante RT-PCR en animales adultos entrenados. De esta manera la vía excitatoria aferente principal en el núcleo estriado presentaría un ajuste sináptico dependiente de actividad previo al ajuste de las vías moduladoras colinérgicas y dopaminérgicas D2.

736. (7541) MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA PERSISTENCIA DE LA MEMORIA. BEKINSCHTEIN, PEDRO (1); MULLER IGAZ, LIONEL (1); IZQUIERDO, IVÁN (2); CAMMAROTA, MARTÍN (1); MEDINA, JORGE (1)

Instituto de Biología Celular y Neurociencia, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires, Argentina; Centro de Memoria, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

La teoría más aceptada acerca de la formación de la memoria de largo término (MLT) sostiene que luego de la adquisición, la memoria atraviesa un período finito de sensibilidad a interferencias comportamentales o farmacológicas denominado consolidación. La consolidación de la MLT requiere de expresión génica y síntesis de novo de proteínas. Para la tarea de evitamiento inhibitorio (EI) existen al menos dos períodos de sensibilidad a la infusión de inhibidores de la síntesis proteica en el hipocampo, uno en el momento de entrenamiento y otro entre las 3 y 6 horas posteriores. Experimentos de cDNA arrays permitieron identificar posibles genes candidatos regulados por el aprendizaje en el hipocampo. Los objetivos de este trabajo fueron analizar el curso temporal de expresión de los productos de estos genes y evaluar el rol de la síntesis proteica tardía en el aprendizaje de EI. La cinética de expresión de algunas de estas proteínas reveló aumentos en los niveles 18-24 hs post-entrenamiento ($p < 0.05$); a las 72 hs los cambios son detectables. Entre

las proteínas analizadas se encuentran CaMKIIa, ERK-2, Homer-1a, Syntaxin 1a, c-fos y Akt. Existen cambios más tempranos entre las 9 y 24 hs de ERK-2 y Casein Kinase IIa. Algunos de estos cambios sólo se producen si el entrenamiento es fuerte y no si es moderado o débil. La inhibición de la síntesis proteica hipocampal a 12 o 24 hs luego del entrenamiento no afectó la consolidación de la memoria en animales testeados a las 48 hs. Sin embargo, la infusión del inhibidor a 12, pero no a 24 hs produjo amnesia respecto a los controles en un grupo de animales testeados a los 7 días del entrenamiento ($p < 0.05$). Estos resultados permiten postular la presencia de un mecanismo hipocampal y síntesis proteica-dependiente posterior al de consolidación, involucrado en el mantenimiento de la traza de memoria o en su almacenamiento a largo plazo. Los aumentos en los niveles de las proteínas analizadas podrían subyacer en parte a este proceso.

737. (7557) DISMINUCION DE LA NEUROGENESIS EN EL HIPOCAMPO DE RATONES ADULTOS DEFICIENTES EN EL RECEPTOR DE NEUROTROFINAS P75NTR. BERNABEU, RAMON (1,2); LONGO, FRANK (1)

Facultad de Medicina, UBA; (1) Department of Neurology, UCSF, USA (2) Instituto de Biología Celular y Neurociencias, UBA

Poco se sabe a cerca del rol de los receptores a neurotrofinas en la regulación de la formación de las células progenitoras de neuronas en el giro dentado del cerebro adulto. Esta es una de las estructuras cerebrales en donde se continúan generando nuevas células durante toda la vida. En ciertos tipos celulares tales como, los precursores de las células grano del cerebelo y en las células cromafines, las neurotrofinas promueven la proliferación. Nosotros estudiamos la participación del receptor p75 (que une a todas las neurotrofinas) en la regulación de la proliferación de las células progenitoras del giro dentado en el cerebro adulto. Ratones p75 wildtype y knockouts (Lee et al., 1992) fueron generados vía sucesivos entrecruzamientos de ratones heterocigotas (Yeo et al, 1997) de una cepa original con un background C57B6/Balb/C/129). Los ratones recibieron inyecciones de BromoUridina (BrdU) por 6 días consecutivos y fueron sacrificados en el 7mo día. La inmunohistoquímica realizada con anticuerpos anti-BrdU y p75 demostró que una gran proporción de las células de la zona subgranular del giro dentado co-expresan dichos marcadores. Una gran proporción de las células positivas para BrdU también co-expresaron el marcador neuronal NeuN y el marcador de astrocitos GFAP. El número de neuronas contadas usando el principio de disección óptica mostró una reducción del 59% de células positivas para BrdU en los ratones Knockout ($n=14$) de p75 en comparación con los wildtype ($n=9$) ($p < 0.001$; test no-paramétrico Mann-Whitney). Esta reducción en el número de células positivas para BrdU se observó tanto para los marcadores de NeuN (neuronas) como para GFAP (astrocitos). No se evidenció una superposición en el número de células contadas en los distintos genotipos (knockout y wildtype), lo que sugiere que la reducción en el número de células positivas para BrdU en los ratones knockout tiene alta penetrabilidad. El receptor p75 contribuyen a la proliferación de los precursores neuronales en el hipocampo de ratones adultos.

738. (7562) PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN GANGLIOS ANEXOS A LA RAÍZ DORSAL Y MÉDULA ESPINAL LUMBAR LUEGO DE LA AXOTOMÍA DEL NERVIÓ CIÁTICO DE LA RATA. CORONEL, M. FLORENCIA; MUSOLINO, PATRICIA L.; VILLAR, MARCELO J.

Area de Investigación, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral

Se ha comprobado recientemente que el óxido nítrico (NO) participa en la neurotransmisión nociceptiva y se han observado variaciones en la expresión y actividad de la isoforma neuronal de la sintasa del óxido nítrico (NOSn), así como en los niveles de su mRNA, en diversos modelos de daño neuropático. El objetivo

del presente trabajo fue monitorear la producción de NO en ganglios anexos a la raíz dorsal (GARDs) y médula espinal (ME) lumbar en un modelo de neuropatía periférica, y correlacionarla con la expresión de la enzima NOSn en los mismos tejidos. Los animales (ratas macho Sprague-Dawley) fueron sometidos a axotomía de su nervio ciático y sacrificados luego de diferentes tiempos de sobrevivencia (1, 7, 14 y 28 días), se diseccionaron y homogeneizaron los ganglios L4-5 ipsi y contralaterales y la ME lumbar en un buffer Tris-ClH 20mM (pH=7,4) con sacarosa 0.32M y EDTA 2mM. Los homogenatos se centrifugaron a 10000 X g por 10 min a 4°C. En los sobrenadantes, la producción de NO fue evaluada mediante la determinación de nitritos y nitratos (NOx), productos de oxidación del NO, usando el NO Analyser 280 (Sievers). Se procesaron asimismo ganglios y médulas de ratas controles. Paralelamente, se perfundieron animales axotomizados y los tejidos fijados fueron procesados para inmunohistoquímica convencional, utilizando un anticuerpo específico para NOSn. Se observó un aumento progresivo de los niveles de NOx tanto en ganglios como en el asta dorsal ipsilateral de la médula espinal. El patrón temporal de aumento de los niveles de NOx fue paralelo al de aumento en la inmunoreactividad de nNOS: gradual pero sin alcanzar significancia estadística en animales con 7 días de sobrevivencia, más marcado a los 14 días ($p < 0.001$), alcanzándose un pico a los 28 días luego de producida la lesión ($p < 0.001$). Estos resultados comprueban la participación del NO en la neurotransmisión del dolor neuropático. Queda por demostrar si este mensajero gaseoso juega un rol pro o antinociceptivo.

739. (7599) SUBTIPOS DE RECEPTORES MUSCARINICOS INVOLUCRADOS EN LA MODULACION DE ADENILATO CICLASA DE CUERPO ESTRIADO DE RATA. SÁNCHEZ, G(1); COLETTIS, N(1); QUILLFELDT, J(2); JERUSALINSKY, D(1); KORNISIUK, E(1)

Instituto de Biología Celular & Neurociencias «Profesor De Robertus», Facultad de Medicina, UBA. 1IBC&N, Fac de Medicina, UBA, Argentina; 2Dpto Biofísica, UFRGS, Brasil.

De los cinco subtipos de receptores muscarínicos (RACHM) descriptos en sistema nervioso central, los receptores M1,3,5 se acoplan preferencialmente a proteínas Gq, y los M2,4 inhiben la actividad de adenilato ciclasa (AC) a través de proteína Gi. Los RACHM más abundantes en estriado son M1 y M4; los demás están presentes en proporciones menores. Investigamos la modulación muscarínica de la actividad de AC previamente estimulada, tanto por forskolina como por dopamina, en membranas sinaptosomales de estriado de rata, utilizando la técnica de Salomon y col. (1974). La interacción funcional entre dopamina y acetilcolina constituye una característica prominente de la neurotransmisión en estriado; el desbalance en este sistema ha sido propuesto como causa de diversas patologías. Forskolina 100 μ M incrementó 2000% la actividad basal de síntesis de AMPc. En una curva de dopamina se produjo un máximo de estimulación para 100 μ M, con un aumento promedio de 20%. La inhibición por el agonista muscarínico oxotremorina, de la estimulación por forskolina, presentó dos fases: una de alta afinidad que redujo la actividad en 15%, y otra de baja afinidad, que la redujo un 50%. Oxotremorina inhibió la estimulación por dopamina también de modo bifásico; la inhibición de alta afinidad alcanzó un 40%. En presencia de dopamina 100 μ M y oxotremorina 10 μ M, la toxina proteica MT3, antagonista selectivo del RACHM M4, revirtió parcialmente la inhibición producida por oxotremorina. Curvas de inhibición de la fijación específica del antagonista 3H-NMS por las toxinas muscarínicas MT1, MT2 y MT3, permitieron estimar los subtipos de RACHM en membranas sinaptosomales de estriado, resultando que el 30 % del total pertenecería al subtipo M4. La reversión de la inhibición muscarínica de AC por el antagonista selectivo M4, así como la abundancia de receptor M4 en el estriado, permiten sugerir que dicho receptor sería el principal regulador muscarínico de la actividad de AC en esa estructura.

740. (7659) AMBIENTE ENRIQUECIDO, ÓXIDO NÍTRICO SINTASA NEURONAL Y PLASTICIDAD SINÁPTICA EN

RATAS PRE-PÚBERES, JÓVENES Y VIEJAS. LORES ARNAIZ, SILVIA (1); BUSTAMANTE, JUANITA (1); CZERNICZYNIENEC, ANALÍA (1); PAGLIA, NORA (2); ARISMENDI, MARIANA (2); GERVASONI, MÓNICA (2); LORES ARNAIZ, MARÍA DEL ROSARIO (2)

(1) Laboratorio de Radicales Libres en Biología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. (2) Laboratorio de Memoria de Trabajo y Estrés, Facultad de Psicología, Universidad de Buenos Aires.

El óxido nítrico (NO) ha sido implicado en la plasticidad sináptica, en la formación de memoria y en el aprendizaje espacial. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del ambiente enriquecido sobre la óxido nítrico sintasa (NOS) y la inducción de plasticidad neuronal en relación a la edad. Se utilizaron ratas de: a) 38 días (pre-púberes), b) 90 días (jóvenes), y c) 27 meses (viejas). Los animales pre-púberes y jóvenes fueron expuestos a ambiente común o enriquecido durante 17 días y las ratas viejas, durante 20 meses. Se realizaron: a) estudios cognitivos, b) determinaciones de actividad de NOS en fracciones mitocondrial y citosólica, c) expresión de NOS por Western blot, d) actividad de complejo I mitocondrial. En ratas pre-púberes y jóvenes se evaluó además el efecto del entrenamiento en el laberinto radial de 8 brazos sobre los parámetros mencionados. En estudios cognitivos, ratas pre-púberes y ratas viejas expuestas a ambiente enriquecido presentaron una mejor performance que sus respectivos controles. En ratas pre-púberes la exposición a ambiente enriquecido provocó incrementos de 80% y 40% en la actividad de la NOS citosólica y mitocondrial de cerebro, y un aumento de 50% en la actividad del complejo I mitocondrial. El entrenamiento aumentó la actividad de la NOS sólo en ratas controles. En ratas jóvenes, el ambiente y el entrenamiento no modificaron los parámetros cognitivos y bioquímicos evaluados. En ratas viejas, la exposición a ambiente enriquecido provocó aumentos significativos en la actividad de la NOS y del complejo I mitocondrial. En ratas pre-púberes y viejas se observó una mayor expresión de nNOS en mitocondrias de cerebro de ratas provenientes de ambiente enriquecido. Nuestros resultados sostienen la hipótesis de que la edad, el ambiente y el entrenamiento modulan la plasticidad neuronal a través de mecanismos moleculares dependientes de NO.

741. (7664) ACCION DE AGENTES PORFIRINOGENICOS SOBRE EL SISTEMA MITOCONDRIAL Y MICROSOMAL DE FASE I EN CEREBRO DE RATON. COMPARACION DE LA RESPUESTA EN OTROS TEJIDOS. LAVANDERA, JIMENA VERÓNICA; BATLLE, ALCIRA ; BUZALEH, ANA MARIA

CIPYP, CONICET, Depto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

En cerebro, el citocromo P450 (CYP) participa en la metabolización de sustratos exógenos y endógenos. La presencia en este órgano del sistema de monooxigenasas sugiere que éstas cumplirían funciones más especializadas que las hepáticas, las cuales están particularmente involucradas en la detoxificación de xenobióticos. En cerebro, el contenido mitocondrial de CYP es significativamente mayor que el microsomal. El objetivo fue evaluar la participación del CYP mitocondrial (CYP MIT) y microsomal (CYP MIC) de cerebro en la metabolización de diferentes agentes porfirinogénicos y comparar los resultados con la respuesta del hígado y riñón. En cerebro, algunos de los agentes porfirinogénicos estudiados alteraron los niveles del CYP MIT (VN 101 ± 10 pmol/mg) pero no el CYP MIC (VN 35 ± 12 pmol/mg). Así, la Griseofulvina produjo un aumento del 70% ($p < 0.05$), mientras que la anestesia crónica con Isoflurano causó una reducción del 30% ($p < 0.01$) en el CYP MIT. En hígado, resultados similares se obtuvieron para los CYPs MIT (VN 385 ± 136 pmol/mg) y MIC (VN 200 ± 100 pmol/mg). No obstante, luego de la anestesia crónica con Isoflurano sólo el CYP MIT disminuyó (36%, $p < 0.05$). Los niveles de CYP en riñón se

modificaron por administración de Veronal (151 ± 36 pmol/mg) y este efecto fue observado en MIT ($VN 101 \pm 37$). Al estudiar el efecto agudo del ácido 5-aminolevulínico, el cual sería responsable de la neuropatología de las porfirias, se detectó una reducción (50%, $p < 0.05$) de CYP en ambas fracciones de cerebro e hígado. Además se compararon los efectos sobre la actividad de la CYP reductasa en cerebro e hígado. Los resultados revelaron respuestas tisulares diferentes frente a los xenobióticos estudiados. Si bien el hígado es el principal tejido involucrado en la metabolización de drogas exógenas, se observó la participación de tejidos extrahepáticos. En cerebro, los niveles de CYP se alteraron más que en riñón y en todos los casos el CYP MIT estuvo principalmente involucrado

742. (7736) DETERMINACIÓN IN VITRO DE ACETILCOLINA EN CULTIVOS NEURONALES. GARCÍA, M¹; MONTEAGUDO, E¹; IELPI, M¹; BURGOS, V¹; CARBALLO, R²; CAMPO D'ALLORTO, V²; ARGIBAY, P¹

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires. Química Analítica Instrumental UBA

El cultivo de regiones específicas del cerebro es una herramienta interesante para evaluar la funcionalidad neuronal en diversas condiciones experimentales. Un punto importante en dicha evaluación es la detección de los diversos neurotransmisores involucrados. Sin embargo, la escasez de las muestras involucradas hace difícil la detección de dichas moléculas. Objetivo: Desarrollar un método analítico cuantitativo que permita evaluar la funcionalidad de neuronas colinérgicas a través de la determinación electroquímica de Acetilcolina (ACh) en cultivo neuronal. Material y métodos: se cultivaron neuronas a partir de explantos de hipocampo en D-MEM suplementado con SFB 10% con el agregado de bromuro de neostigmina. Para la detección de ACh se utilizó en forma combinada una columna de cromatografía líquida de alta presión con electrodos de inmovilización de las enzimas acetilcolinesterasa y colina Oxidasa. El peróxido de hidrógeno producido en la reacción enzimática se cuantificó electroquímicamente. Resultados: El límite de detección fue de 5 nmol en 10 μ l. En cuanto a la reproducibilidad la variación de 12 muestras de solución standard procesadas en diferentes días fue menor del 4%. Los cromatogramas obtenidos del sobrenadante de los cultivos correlacionaron perfectamente con los estándares utilizados. El sistema utilizado para determinar acetilcolina en el sobrenadante de cultivos de neuronas colinérgicas demostró ser un método, sensible, reproducible y específico que nos permitiría evaluar modificaciones en la funcionalidad y viabilidad de las mismas.

743. (7810) EL TRATAMIENTO CON HIDROCORTISONA MODIFICA LOS CAMBIOS DEL CITOESQUELETO ASTROCITARIO INDUCIDOS POR EXPOSICIÓN A PLOMO. LOIDL, C. FABIÁN; SEVÍN-TESTA, ASIA; CAPANI, FRANCISCO; COIRINI, HÉCTOR

IBCyN «Prof. Dr. E. de Robertis», IBYME, Dpto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

En estudios previos hemos demostrado que la exposición crónica a plomo (Pb, 1g%) en el agua de bebida durante 2 meses, produce en ratas, un aumento en la expresión de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) y de vimentina (VIM) en la corteza cerebral e hipocampo. Describimos además cambios ultraestructurales en los astrocitos, tales como hipertrofia gliofilamentosa y edema citoplasmático. Los animales intoxicados presentan una marcada hiperactividad en reposo y un aumento en la excitabilidad en el momento de su manipulación. Con el objetivo de estudiar el posible efecto neuroprotector de los glucocorticoides en animales intoxicados, un grupo de estos, fue tratado con hidrocortisona (HC, 5mg/100g peso) mediante inyecciones s.c. diarias, durante 21 días, y otro grupo fué inyectado con vehículo (aceite vegetal). Las inyecciones se realizaron en diferentes zonas para evitar ulceraciones. Se utilizó además un tercer grupo

control (CTL) no intoxicado y con vehículo. Los animales (ratas macho Sprague-Dawley adultas) fueron sacrificados a 1, 7, 14 y 21 días de finalizado el tratamiento con HC y los cerebros procesados para el estudio de la expresión de GFAP, VIM y para microscopía electrónica (ME). En el grupo de ratas tratadas con HC, sólo en los animales sacrificados los días 14 y 21 se observó una menor expresión de gliofilamentos inmunotefidos con GFAP y VIM e imágenes de astrocitos normales, similares a los controles, por ME. En ningún grupo experimental se observaron cambios neuronales. Desde el punto de vista comportamental, los animales tratados con HC presentaron hipoactividad y un aumento en la mortalidad al poco tiempo del tratamiento. La HC al inducir cambios conductuales y revertir las modificaciones producidas por el Pb evitando la reacción astrogial, actuaría como un neuroprotector, modificando el microambiente neuronal. Sin embargo, la dosis usada produce una alta mortalidad en los animales pocos días después de finalizado el tratamiento. (UBACYT - M020).

744. (7875) MODULACIÓN DIFERENCIAL DE FOSFATIDATO FOSFOHIDROLASA (PAP2) Y DIACILGLICÉRIDO LIPASA (DGL) POR LÍPIDOS FOSFATOS EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO. PASQUARÉ, SUSANA; GIUSTO, NORMA

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

Hemos demostrado en sinaptosomas la presencia de la isoforma PAP2 de fosfatidato fosfohidrolasa y la estimulación por envejecimiento de esta actividad. PAP2 pertenece a una familia de enzimas llamadas Lipido Fosfato Fosfohidrolasas (LPPs) que hidrolizan además de ácido fosfatídico (PA) otros sustratos lipídicos fosforilados como ácido lisofosfatídico (LPA), ceramida-1-fosfato (C-1-P) y esfingosina-1-fosfato (S-1-P) (Brindley y Waggoner, J. Biol. Chem. 273, 21281-21284, 1998), generando esto distintas moléculas mensajeras. El objetivo de este trabajo fue estudiar la posible modulación de la PAP2 en sinaptosomas, por los distintos sustratos fosforilados y analizar como el envejecimiento influye en tal modulación. Los sinaptosomas fueron preparados a partir de corteza cerebral de ratas adultas (3 meses) y seniles (26 meses) y purificados por gradiente discontinuo de ficoll. La PAP2 fue ensayada según lo descrito por Brindley et.al. (Methods in Enzymol. 197, 553-563, 1991), empleando como sustrato PA marcado radioactivamente. La actividad DGL se ensayó a partir del producto generado por PAP2. Las concentraciones para los tres sustratos estudiados fueron de 50 y 100 μ M. La PAP2 de membranas adultas presentó el mismo comportamiento frente a los tres sustratos. LPA, C-1-P y S-1-P redujeron la actividad de PAP2 un 12%, 31% y 20% a 50 μ M y 25%, 27% y 20% a 100 μ M, respectivamente, en sinaptosomas de ratas seniles comparadas a las actividades de sinaptosomas adultos. La presencia de LPA, C-1-P o S-1-P disminuyó la actividad de DGL un 18%, 37% y 30%, a 50 μ M y 30%, 20% y 15% a 100 μ M, respectivamente, en sinaptosomas de ratas seniles comparadas a las actividades de sinaptosomas adultos. Estos resultados muestran un comportamiento diferencial de PAP2 y DGL, frente a los inhibidores ensayados, por el envejecimiento.

745. (7948) EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA FRENTE A LA INYECCIÓN DE LA PROTEÍNA BETA AMILOIDE EN EL NÚCLEO BASAL MAGNOCELULAR DEL HÁMSTER DORADO. BRUNO, VERÓNICA; CACCURI, ROBERTO; CARDINALI, DANIEL; CUTRERA, RODOLFO

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

El objetivo fue evaluar "in vivo" el efecto protector de la melatonina (MT) frente a una lesión producida por el fragmento 25-35 de la proteína β amiloide (β A) en el Núcleo Basal Magnocelular (NBM) del hámster dorado. Para esto, hembras adultas, fueron inyectadas unilateralmente en el NBM con dicho

fragmento o solución salina. Quince días antes, la mitad de los animales de los 2 grupos recibió MT en el agua de bebida (25 ug/ml), conformándose los siguientes grupos: agua-sham; MT-sham; agua- β A; MT- β A (n=8 en cada uno). Los animales fueron sacrificados 21 días luego del tratamiento. Los cerebros fueron extraídos, cortados y coloreados con la técnica de Nissl. Se tomó en cuenta: que la lesión estuviera incluida dentro del NBM, las características de las grandes neuronas, de las células gliales y de la sustancia intercelular. En el grupo agua- β A se observaron neuronas grandes, retraídas, con ausencia de núcleos (que sugiere muerte celular), edema intersticial moderado, gliosis moderada con células con núcleo claro y grandes, indicativos de movilización y activación glial. En los sectores más alejados, se observaron neuronas con signos de sufrimiento. El grupo MT- β A presentó signos histológicos compatibles con sufrimiento y posterior recuperación neuronal incluyendo neuronas con núcleo grande y claro, nucléolo presente, sustancia de Nissl con distribución e intensidad tinte intensa, contorno neuronal conservado e inicio de prolongaciones. No se observaron cambios en los grupos agua-sham y MT-sham. Si bien se conoce que la melatonina presenta un efecto protector "in vitro" frente a lesiones con beta amiloide, es la primera vez que se demuestra un efecto protector "in vivo" para esta hormona en el NBM.

NEUROCIENCIAS 9: CELULAR Y MOLECULAR 6/ CRONOBIOLOGÍA 1 / COGNITIVAS Y PSIQUIATRÍA 1

746. (6784) PARTICIPACIÓN DE CGMP Y CKI EPSILON EN LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADOS EN LA SINCRONIZACIÓN CIRCADIANA. AGOSTINO, PATRICIA; PLANO, SANTIAGO; GOLOBEK, DIEGO

Laboratorio de Cronobiología, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina

La administración de pulsos de luz durante la noche sincroniza al reloj biológico de mamíferos, retrasando su fase durante la noche temprana y adelantándola durante la noche tardía. En ambos procesos participan vías específicas de transducción de señales que involucran Ca(2+), CaMKII y nNOS. Río abajo del NO, para adelantos de fase está descrita la vía GC/cGMP/PKG. A nivel comportamental, mientras que los retrasos ocurren inmediatamente, los adelantos ocurren en forma gradual, con transientes de varios días. El objetivo de este trabajo fue analizar y comparar el comportamiento de hamsters normales y de hamsters mutantes tau (poseen actividad deficiente de la enzima CKIe) durante los avances de fase, en especial la dependencia de la magnitud de los adelantos y de los transientes con la intensidad de la luz. Los resultados indican que la respuesta a la luz de los hamsters tau no depende de la intensidad del pulso, en contraste a lo que sucede en los wild-type. Una de las principales hipótesis es que las diferencias entre adelantos y retrasos se basan en distintos sustratos neuroquímicos. Existe poca información acerca de cuál isoforma de fosfodiesterasa (PDE) se expresa en los NSQ, aunque hay evidencias que apuntan hacia PDE5 y PDE9. Inhibidores específicos de PDE inyectados en forma previa al pulso de luz mostraron un mayor adelanto que los controles. Por otra parte, en experimentos de ICC de cGMP se observó mayor cantidad de células marcadas en los animales tratados con inhibidores de PDE. La caseína quinasa Ie (CKIe) fosforila genes reloj, modificando su metabolismo. Los niveles de mRNA de CKIe son constantes a lo largo del día; en este trabajo se realizaron geles de fosforilación para medir ritmo de actividad de CKIe, con un pico de actividad alrededor de CT 12, momento que coincide con una caída en los niveles de PER1. Resta determinar si CKIe participa en la regulación de los transientes durante los adelantos de fase y dónde ocurre la regulación temporal (gating) de los cambios de fase.

747. (6794) ÓXIDO NÍTRICO EN EL RELOJ BIOLÓGICO: «NO» EN LA NOCHE TARDÍA PERO NO EN LA NOCHE TEM-

PRANA. PLANO, SANTIAGO; AGOSTINO, PATRICIA; GOLOBEK, DIEGO

Laboratorio de Cronobiología, UNQ.

La luz incide sobre el núcleo supraquiasmático (NSQ) vía el tracto retinohipotalámico. La región encargada de recibir esta señal glutamatérgica es la porción ventral del NSQ, que la transmite hacia la región dorsal. El óxido nítrico (NO), un conocido mensajero gaseoso, podría estar involucrado en dicha comunicación. En mamíferos, la administración con un pulso de luz durante la noche tardía provoca un adelanto de fase en los ritmos de actividad, además de activar al factor de transcripción, de expresión inmediatamente temprana, cFOS. En este trabajo analizaremos el rol del NO en la comunicación celular intra- NSQ. Para ello estudiamos la actividad en rueda de hamsters y su comportamiento luego de aplicarles un pulso de luz (5 min. 500 lux) a la hora circadiana (CT) 18 (noche tardía, 6 horas luego del comienzo de la actividad locomotora) con y sin la inyección i.c.v. del secuestrador extracelular de NO PTIO (100 mM, 1 ml durante 1 min), 30 minutos antes del pulso. La inyección de PTIO previa al pulso de luz fue capaz de bloquear los avances de fase fóticos. Por otro lado, estudiamos el patrón temporal de distribución ventro-dorsal de cFos por inmunocitoquímica luego del pulso de luz, y el efecto del PTIO sobre esta variable. El secuestrador de NO inhibió significativamente la expresión de cFOS inducida por luz. Resultados preliminares a CT 14 (donde un pulso de luz provoca un retraso de fase), utilizando el mismo procedimiento que a CT 18, mostraron que la administración de PTIO previa al pulso de luz no provoca ningún efecto sobre el mismo. Esto sugeriría que la comunicación a CT 14 sería independiente del NO. Estos resultados sugieren que el NO podría actuar como un mensajero transcelular en la mediación del mensaje fótico en el reloj biológico de mamíferos a CT 18, y no a CT 14.

748. (7134) EARLY OLFACTORY DEFICIT ASSOCIATED WITH ALCOHOL ABUSE. OTERO-LOSADA, MATILDE

Neurociencias. LIS. CONICET. Hosp. de Clínicas. UBA

Olfactory dysfunction, a finding prevalent among alcoholic Korsakoff patients, has been the subject of previous extensive research. A single time continuum of cognitive deterioration associated with alcohol abuse has been proposed where chronic alcoholics and alcoholic Korsakoff patients represent two different points on the basis that alcoholics are impaired on odor quality discrimination but appear to perform normally on complex hue discrimination. However, the initial time points in the continuum are scarcely studied even at these days, i.e.: the early steps into alcoholism (addiction), at present a most critical item in youth healthcare. Aim: to study central and peripheral olfaction in not dependent young ethanol abusers, cognitively normal (daily labours, no amnesia or dementia). Procedures. Subjects' sample: 2 groups (n=18 each) matched for sex, age, smoking behavior & sociocultural indicators: Ethanol, Control (social/moderate drinkers, non drinkers). Measures: A). Olfactory thresholds: n-1-butanol (1); B). Identification (extrinsic pathway), UPSIT: 40 microencapsulated odors, associative memory (long term), odor-verbal label (2).; C). Recognition/Identification (intrinsic pathway): associative memory (recent) odor-odor (3). Two-way analysis of variance, SPSS(TM) 10.0 (3). Our findings agree with the hypothesis of a time continuum for smell deficit linked to alcoholism (4) and show the first evidence of sensory deficit in not dependent young ethanol abusers (5). Acknowledgement: to Quest International and Degussa Flavors & Fragrances. 1. Doty RL et al. *Physiol Behav.* 32(3): 489-502, 1984. 2. Doty RL. *The SIT (TM)*. 3rd Edition. Haddon Hts NJ: Sensonics, Inc. 1995. 3. Otero-Losada, M. *Biocell* 28 (1): p.117, 2004. 4. Parsons O. A. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22: 954-961, 1998. 5. Rupp C. I., Kurz M. et al. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 27 (3):432-9, 2003.

749. (7415) LA APOTRANSFERRINA MODULA DIFERENCIALMENTE LA EXPRESIÓN DE MBP EN DOS LÍNEAS

CELULARES OLIGODENDROGLIALES. PAEZ, PABLO; GARCIA, CORINA; SOTO, EDUARDO; PASQUINI, JUANA

Depto de Qca Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET; Bs As, Argentina.

Recientemente hemos demostrado que la apotransferrina (aTf) promueve la diferenciación de dos líneas oligodendrogliales (OLG), N19 y N20.1, que representan estadios diferentes en la maduración del OLG (Verity y col 1993). Aunque en ambas líneas la aTf indujo la expresión de MBP, solamente en las células N19 observamos un incremento en los niveles de AMPc y pCREB, sugiriendo que la regulación de este gen involucra diferentes vías de señalización (Paez y col 2004). Transfectamos ambas líneas con una construcción conteniendo 750 pb de la zona proximal del promotor de MBP fusionado al gen reportero lacZ (Wrabetz y col 1998). En ambas líneas celulares transfectadas, el agregado de aTf al medio produjo una activación de esta porción mínima del promotor. Con el objetivo de dilucidar los factores de transcripción involucrados en esta acción realizamos ensayos de Western blot y EMSA para los principales factores activadores del gen de mbp presentes en esta zona del promotor. En las células N20.1 (más maduras), luego de 2hs de tratamiento con aTf observamos un aumento en la expresión de las diferentes isoformas de los receptores de hormona tiroidea (T3) y de Sp1. Concomitantemente, ambas líneas celulares cultivadas con aTf mostraron un aumento en los niveles del receptor de glucocorticoides (GR) y del complejo transcripcional NFkB acompañado por una disminución en la expresión de su inhibidor IkB. En resumen, estos datos sugieren que las vías de señalización involucradas en el control de la expresión de MBP por la aTf son dependientes del estado maduracional del OLG. En las N19 este control podría estar mediado a través de la vía de AMPc y pCREB, en contraste, en las células más maduras (N20.1), la activación del promotor podría deberse a la participación de T3 y Sp1, conocidos inductores del gen mbp. Adicionalmente, tanto GR como NFkB podrían participar en la activación de MBP en ambos estadios de diferenciación.

750. (7462) DIFERENCIACIÓN NEURONAL A PARTIR DE CÉLULAS MESENQUIMALES OBTENIDAS DE MÉDULA OSEA HUMANA Y EXPANSIÓN IN VITRO. CALLERO, FLORENCIA; DI RISIO, CATALINA B.; HIDALGO, ALEJANDRA; ARGIBAY, PABLO

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME). Hospital Italiano. Buenos Aires

Introducción: Las células mesenquimales (CMs), son células multipotentes que se encuentran en diferentes tejidos del cuerpo, en especial en la médula ósea (MO). En medio de cultivo se adhieren al sustrato y proliferan por varias generaciones. Se ha postulado a estas células como fuente potencial de diversas estirpes celulares (neuronales, hepáticas, musculares, cardíacas y óseas), que podrían utilizarse para reparar daños funcionales. **Objetivo:** Obtener CMs de MO para inducir su diferenciación a células de fenotipo neuronal. **Materiales y Métodos:** Se cultivaron 21 muestras de MO humana de adultos sanos en medio IMDM + 20% de Suero Fetal Bovino (SFB) + 10ng/ml de Epidermal Growth Factor y se sometieron a pasajes sucesivos. Las muestras, llegadas al 8° o 10° repique se preindujeron con 1mM β Mercapto Etanol (β ME) + 20% SFB, durante 2 días. Para la inducción neuronal se incubaron otros 2 días en presencia de varios diferenciadores: 2 mM de β ME, 2% de Dimetil Sulfóxido, 200mM de Butilato de Hidroxianisola y 10(-6) M de Acido Retinóico, en IMDM y ausencia de SFB. Se analizó la diferenciación neuronal por medio de un análisis inmunocitoquímico. Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% y se utilizaron anticuerpos específicos: para neuronas maduras (anti-Neu-N y anti-neurofilamentos de 200KD) y para astrocitos (anti-GFAP). Se cuantificó el índice de diferenciación a través del conteo por placa. **Resultados:** Luego de la diferenciación se observó una positividad para Neu-N del 37% y para neurofilamento del 1%. **En conclusión,** dado lo accesible del tejido medular, la potencial obtención de células de diversos fenotipos neurales y el poste-

rior autotrasplante sin riesgos de rechazo, la presente línea de investigación abre un terreno promisorio en la reparación funcional de diversas patologías neurodegenerativas.

751. (7551) EL ESTRÉS INESCAPABLE PRODUCE UNA DISMINUCIÓN PRECOZ EN LOS NEUROFILAMENTOS LIVIANOS DE LAS CÉLULAS HIPOCAMPALES DE LA RATA. PEIXOTO, ESTANISLAO; FERRERO, ALEJANDRO; CERESETO, MARINA; SIFONIOS, LAURA; GUELMAN, LAURA; WIKINSKI, SILVIA

1 Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires e ININFA (CONICET), 2 Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

En trabajos anteriores observamos que cuatro días después de la exposición a un estrés inescapable los animales presentan una conducta de desesperanza que persiste al menos por 21 días, tiempo en el cual se observa una disminución significativa de los neurofilamentos de 68 KDa (NF68) en diversas áreas del hipocampo. Con el objeto de determinar la evolución temporal de esta disminución evaluamos los cambios en dicha proteína en diferentes tiempos post-estrés: 1 hora, 4 días y 21 días. Animales expuestos a un modelo de estrés inescapable (60 shocks eléctricos de 0.6 mA, de 15 segundos de duración, a lo largo de una hora) fueron anestesiados y perfundidos con una solución fijadora de paraformaldehído. La presencia de neurofilamentos de 68 KDa fue evaluada mediante inmunohistoquímica. Se cuantificó el área inmunorreactiva para dicha proteína en las áreas CA3 y giro dentado (GD) del hipocampo. Encontramos una disminución significativa de NF68 tanto a la hora del estrés (1h) como a los 4 (4d) y a los 21 días (21d) en las dos áreas estudiadas. Los resultados son los siguientes, expresados en porcentaje respecto del control. Para GD: 1h, 43% (p=0.012); 4d, 53% (p=0.0073); 21d, 60% (p<0.001). En CA3: 1h, 63% (p<0.0001); 4d, 55% (p=0.0015); 21d, 56% (p<0.05). Los resultados fueron comparados con el test t de Student. Podemos concluir que la exposición a un estrés inescapable produce cambios precoces en la inmunomarcación para NF68 que podrían explicarse por una estimulación del sistema de degradación celular y/o por cambios conformacionales de la proteína, que impiden su reconocimiento por el anticuerpo. Este trabajo fue financiado con los siguientes subsidios: PICT 05-11102 y UBACyT FM013.

752. (7638) INTERACCIONES DE ESTEROIDES CON MEMBRANAS NATIVAS DE TORPEDO CALIFORNICA RICAS EN RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO. FERNANDEZ NIEVAS, GASPAS A.; BARRANTES, FRANCISCO J.; ANTOLLINI, SILVIA S.

INIBIBB y Cátedra UNESCO de Biofísica y Neurobiología Molecular. Bahía Blanca.

Una gran variedad de moléculas inhiben la función del receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) de un modo no-competitivo. Muchas de ellas lo hacen mediante el bloqueo del propio canal del AChR (fenciclidina, etidio, QX-222). Un segundo grupo de inhibidores no-competitivos, entre los que se encuentran los esteroides y los ácidos grasos libres (AGL), ejercerían su acción mediante mecanismos aún no dilucidados. En este trabajo estudiamos la posible localización de sitios para esteroides en membranas de *T. californica* ricas en AChR. Realizamos estudios de transferencia de energía resonante (FRET) entre la fluorescencia intrínseca del AChR, como donante, y la sonda Laurdan (6-dodecanoil-2-(dimetilamino)naftaleno) como aceptor. Utilizamos la disminución de la eficiencia de dicho proceso (E), ocasionada por la presencia de inhibidores no competitivos altamente hidrofóbicos, para identificar potenciales sitios de interacción. Se estudió el efecto del agregado individual de distintos esteroides (cortisona, hidrocortisona y 11-hidroxi-progesterona) y del ácido araquidónico (20:4) y de la competencia entre ellos. Todos los compuestos ocasionaron disminuciones semejantes de E. Estudios competi-

vos mostraron que en condiciones saturantes de una primera molécula, el agregado de una segunda no ocasiona mayores variaciones en la disminución de E. Estudios de FRET y E en membranas sometidas a hidrólisis controlada con proteinasa K sugieren que dichos sitios estarían en porciones transmembrana del AChR, ya que los mismos fueron resistentes a la digestión que la proteinasa K ejerce sobre las porciones extracelulares del AChR. Se postula un mecanismo de interacción AChR-esteroide semejante al ya propuesto para los AGL, es decir, por presencia de sitios para esteroides, comunes a los previamente caracterizados para AGL, que se localizarían en la interfase lípido-proteína. Este trabajo fue realizado con subsidio TWAS a S.S.A.

753. (7663) LA DEPLECIÓN CRÓNICA DE COLESTEROL ALTERA EL TRÁFICO DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO EXPRESADO EN CÉLULAS CHO. GALLIGOS, CRISTINA E.; PEDICONI, MARÍA F.; ROCCAMO, ANA M.; DE LOS SANTOS, ELISA B.; BARRANTES, FRANCISCO J.

INIBIBB y Cátedra UNESCO de Biofísica y Neurobiología Molecular. Bahía Blanca.

El colesterol (Chol) es el lípido neutro más importante para la modulación funcional del receptor de acetilcolina nicotínico (AChR). Estudiamos los efectos de la depleción metabólica crónica del Chol por la droga Mevinolina (Mev), inhibidor de la enzima reguladora de la biosíntesis de Chol, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, sobre el tráfico exocítico del AChR en células CHO-K1/A5, clon que expresa el AChR muscular adulto, recurriendo a la combinación de técnicas bioquímicas, farmacológicas y de microscopía de fluorescencia. El tratamiento con 0.5 mM Mev por 48 h en medio delipidado (Nutridomabo) disminuyó el contenido de Chol de la membrana plasmática en un 40%. Concomitantemente, el Bmáx del antagonista competitivo a-bungarotoxina (a-BTX) ligado al AChR de superficie disminuyó de 647 ± 30 a 352 ± 34 fmol/mg proteína en las células tratadas, sin que se modificase la Kdapp de la a-BTX. La IC50 para el antagonista competitivo d-tubocurarina fue también similar a la obtenida en células controles. El tratamiento con Mev disminuyó la señal de fluorescencia (~70%) de AChR de superficie en células tratadas respecto de las controles. La distribución del AChR intracelular fue también afectada, observándose un patrón de fluorescencia de Alexa Fluor594-a-BTX altamente compartimentalizado, con una prevalente acumulación en un casquete perinuclear. Este patrón fue similar al observado en células incubadas a 20°C (bloqueo a nivel del trans-Golgi network, TGN) y se mantuvo inalterado luego de la incubación con Brefeldina A (desensambladora de Golgi pre-TGN). Estudios de colocalización del AChR con proteínas marcadoras de trans-Golgi/TGN permitieron determinar un elevado índice de solapamiento de las señales fluorescentes correspondientes a AChR y proteínas marcadoras del compartimento TGN. La depleción crónica de Chol afecta el tráfico del AChR desde TGN hacia la membrana plasmática favoreciendo su retención en el Complejo de Golgi.

754. (7676) INHIBITORY ACTION OF THE ANTIPILEPTIC DRUG LAMOTRIGINE ON THE NEURONAL ALPHA-7 NICOTINIC RECEPTOR. VALLES, ANA SOFIA; GARBUS, INGRID; BARRANTES, FRANCISCO J.

INIBIBB y Cátedra UNESCO de Biofísica y Neurobiología Molecular. Bahía Blanca.

The neuronal nicotinic acetylcholine receptor (AChR) is a pentameric protein formed by the combination of alpha2-alpha9 and beta2-beta4 subunits in neuronal AChRs. Neuronal AChR are affected by many different types of drugs and constitute pharmacologically important therapeutic targets. Some forms of hereditary epilepsies have been found to be associated with genes coding for the alpha-7 AChRs. Evidence for linkage has been reported for a susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy, a genetically determined common subtype of idiopathic

generalized epilepsy in the chromosomal region 15q14 that harbors the gene encoding the only subunit of the pentameric alpha-7 AChR. Lamotrigine (LTG) is a triazine compound chemically unrelated to any other antiepileptic drug. The precise mechanism(s) by which LTG exerts its anticonvulsant action are unknown. Pharmacological studies suggest that LTG inhibits voltage-sensitive sodium-channels, thereby stabilizing neuronal membranes and consequently modulating presynaptic transmitter release of excitatory amino acids. Previous work from our laboratory on the muscle-type, adult AChR heterologously expressed in CHO-K1/A5 cells established the inhibitory action of LTG on this peripheral form of AChR. The present study was designed to explore the pharmacological effects of LTG on the neuronal alpha-7 AChR heterologously expressed in the epithelial cell line SHEP-1, using the patch-clamp technique. Exposure to the drug shortened the duration of the open channel state and increased the duration and area of the briefest component of the channel closed state, without significantly affecting burst duration. In the range tested (up to 400 µM), LTG appeared to produce a dose-dependent channel block. When fitted to a linear sequential kinetic scheme the forward rate constant was calculated to be 9.2×10^6 M(-1)s(-1). LTG produces a very fast blocking effect on the alpha-7AChR channel.

755. (7681) EL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DE LA GLIA ESTIMULA LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER. INSUA, MARÍA FERNANDA; POLITI, LUIS

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

Las células gliales han sido propuestas como potenciales generadoras de nuevas neuronas ante procesos degenerativos en la retina. Es de gran importancia entonces conocer los factores y mecanismos que controlan su proliferación y diferenciación. Hemos demostrado previamente que el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) previene la apoptosis de los fotorreceptores de retina de rata y estimula su diferenciación. En este trabajo estudiamos la capacidad de las células gliales de Müller de retina de rata de producir GDNF y los efectos de este factor sobre la proliferación glial. Mediante técnicas inmunocitoquímicas y western blot se determinó que las células gliales expresaron GDNF y fueron capaces de liberarlo al medio, tanto en cultivos puros como en cocultivo con neuronas. El agregado exógeno de GDNF (4 ng/ml) promovió la proliferación glial, estimulando la incorporación de bromo deoxiuridina (BrdU) en cultivos gliales puros. Cuando células gliales cultivadas en un medio de diferenciación, que inhibe su proliferación, fueron tratadas con GDNF, aumentaron su incorporación de BrdU, sugiriendo que el GDNF indujo su reentrada al ciclo celular. Para analizar el efecto del GDNF sobre la diferenciación glial, se determinó la expresión de CRALBP, marcadora de células de Müller diferenciadas. Mientras que en medios con o sin suero, cerca del 90% de las células gliales expresaron CRALBP, el agregado de GDNF disminuyó este porcentaje a casi un 35 %. Estos resultados permiten proponer que la liberación de GDNF por la glia estimularía en forma autócrina la proliferación glial, retardando la diferenciación de estas células. Estos efectos son semejantes a los que demostráramos previamente en neuroblastos precursores de fotorreceptores, a los que mantiene en el ciclo celular, retardando su diferenciación. Esto sugiere que el GDNF liberado por la glia promovería la preservación en la retina de un reservorio de células indiferenciadas con marcado potencial proliferativo, que podrían proveer a este tejido de nuevas glias o nuevas neuronas.

756. (7703) GAL4 CAUSES NEURONAL DEATH IN DROSOPHILA. REZAVAL, CAROLINA; CERIANI, M. FERNANDA

Fundación Instituto Leloir

Rest-activity cycles display daily fluctuations that accompany cycles of light and dark in a characteristic pattern. In *Drosophila*,

the lateral neurons (LNs) play a central role in the control of locomotor rhythms. To expand our understanding about this behavior we employed the GAL4/UAS system, a widely used tool for targeting gene expression to different cell types in *Drosophila*. During the course of our work we observed that transgenic lines overexpressing the transcriptional factor GAL4 specifically in the LNs (*pdf-gal4*) displayed abnormal locomotor rhythms. The extensive application of this driver line prompted us to investigate the cause underlying such phenotype. We found that increased GAL4 accumulation positively correlated with a decrease in behavioral rhythmicity, which in turn was associated with a reduction in the number of LNs. Overexpression of HSP70 and baculovirus p35 rescued the arrhythmic phenotype, strongly suggesting the LNs were undergoing cell death. Confocal analysis of PDF neurons showed colocalization of PDF and tunel staining (a marker of nuclear fragmentation), clearly indicating that accumulated GAL4 protein triggers cell death via apoptosis. Programmed cell death as a result of GAL4 accumulation is not a result of a special sensitivity of this neuronal circuit, since similar results were obtained in parallel following GAL4 continuous expression in the developing eye. The GAL4/UAS system has been used to introduce human disease genes into *Drosophila*, express them in specific neural structures and determine whether this expression confers a phenotype that resembles the human disorder. In several examples to date, as the *Drosophila* model of Parkinson (Nature 2000 404: 394), Alzheimer (Science 2001 293:711) and Huntington (Neuron 1998 633:642), the similarity to the modeled human pathology has been remarkable. Our data suggests that high level of GAL4 has per se deleterious effects on cell viability, which should be taken into account when employing this strategy to model neurodegenerative diseases.

757. (7857) LA ADMINISTRACIÓN DE LPS DISMINUYE EL CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE ÁCIDO GLUTÁMICO Y LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LH EN EL HÁMSTER DORADO. REYNOSO, ROXANA; BOGGIO, VERÓNICA; BOLLERO, GABRIELA; SCACCHI, PABLO; MOGUILLEVSKY, JAIME; CARDINALI, DANIEL; CUTRERA, RODOLFO

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

Trabajos previos postulan que la disminución de la liberación de LH por la administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS) guarda relación con el efecto inhibitorio de la endotoxina sobre la secreción de aminoácidos excitatorios hipotalámicos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del LPS sobre la secreción de LH y el contenido hipotalámico de ácido glutámico (Glu) y aspártico (Asp) en dos horarios: durante el período de luz (ZT6) y la oscuridad (ZT18) definiendo ZT12 como la hora de apagado de las luces. Para ello, se inyectó LPS (30mg/kg, i.p.) o vehículo (n=8 por grupo) a hámsteres dorados machos adultos que fueron sacrificados 3 horas después. Se recolectó la sangre troncal para la determinación de LH sérica (RIA, ng/ml) y se disecó el área preóptica/hipotálamo medio basal para la medición del contenido de aminoácidos (HPLC, nmol/mg de prot). Luego de la administración de LPS, los niveles plasmáticos de LH mostraron una reducción significativa ya sea a ZT6 (69%) como a ZT18 (70%) ($p < 0.01$). Sorpresivamente, esto se acompañó de una disminución significativa del contenido de Glu a ZT6 (39%) y a ZT18 (38%) ($p < 0.01$), sin efecto sobre el de Asp. La inhibición de la secreción de LH observada a ambos horarios concuerda con los hallazgos de trabajos previos. Sin embargo, es contradictoria respecto de la disminución observada en el contenido de Glu, que en general coexiste con aumento en los niveles plasmáticos de LH. Se postula que la endotoxina podría producir la liberación de factores inhibitorios (por ej. GABA) cuya acción predominaría sobre la del ácido glutámico.

758. (7937) LA CORRELACIÓN ENTRE FASE Y PERIODO CIRCADIANO DE LA CONDUCTA DE BEBIDA ES INDEPENDIENTE DE LA SINCRONIZACIÓN MATERNA.

VAQUÉ, ALVARO .; MACCHIONE, ANA F ; BELLAVÍA, SALVADOR L ; VERMOUTH, NELIA T

Facultades de Odontología y Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

En mamíferos, una comunicación temporal materna sincroniza el sistema circadiano desde antes del nacimiento. En estudios previos demostramos, que tanto la lesión de los núcleos supraquiasmáticos como la extirpación de la glándula pineal materna durante la gestación temprana, alteran el mecanismo de sincronización del reloj fetal sobre la conducta de bebida en crías de ratas durante el período postnatal (SAN 2002). El objetivo de este trabajo fue investigar la posible correlación entre los parámetros circadianos (Fase, período, alfa) del ritmo de bebida en madres y crías de ratas. Se utilizaron ratas preñadas mantenidas bajo un fotoperíodo L-O (luz: 6:00-20:00h), sometidas a diferentes modelos experimentales (pinealectomía o deservación simpática de la glándula pineal por extirpación de los ganglios cervicales superiores en el día 8 de preñez). En el día 21 de gestación las madres se trasladaron a oscuridad constante y se mantuvieron en esa condición lumínica durante todo el experimento, al igual que sus crías. Como control se utilizaron crías de madres enteras sin tratar. El estudio comprendió el registro de conducta bebedora durante tres semanas a partir del día de destete. Los datos fueron analizados por estadística circular y test de correlación de Pearson. Los resultados muestran que tanto las madres como sus crías, sincronizadas o no, presentan una correlación negativa significativa entre los valores de fase y período ($p < 0.001$). Por el contrario, en ninguno de los grupos experimentales se halló correlación entre alfa y los otros parámetros rítmicos. Aparentemente existiría una dependencia en el mecanismo que controla de variación de fase y período del ritmo circadiano de conducta de bebida en ratas. En crías esa correlación sería independiente del grado de sincronización materna.

759. (7957) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS SOBRE LOS RITMOS DE TEMPERATURA CORPORAL DEL HÁMSTER DORADO. BRUNO, VERÓNICA; SCACCHI, PABLO; PÉREZ LLORET, SANTIAGO; NICO, ANGELES; TAQUINI, VICTORIA; CARDINALI, DANIEL; CUTRERA, RODOLFO

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

La temperatura corporal constituye una de las múltiples variables fisiológicas que presentan ritmos regulados y sincronizados por un oscilador primario ubicado en los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos (NSQ). Por otra parte, la inoculación experimental del lipopolisacárido bacteriano (LPS) produce alteraciones sistémicas, que incluyen un aumento de la temperatura corporal. El objetivo de este trabajo fue evaluar si existe un efecto diferencial del LPS sobre el ritmo de temperatura corporal, dependiendo del momento de la administración. Para ello, hámsteres dorados (machos, adultos, n= 8 por grupo) fueron alojados en jaulas individuales bajo un fotoperíodo de 14:10 LO. Se inyectó LPS o solución salina i.p. a ZT 5, ZT12 (apagado de las luces), ZT17 y ZT22 (encendido). La temperatura corporal fue monitoreada continuamente (Dataquest III-Minimitter, Circadia). Se analizaron las 5 primeras horas postratamiento (efecto agudo) y el ritmo de temperatura (5 días postratamiento). Durante las transiciones el LPS tuvo un efecto diferencial, provocando un aumento de la temperatura corporal a ZT22 ($p=0.009$) y disminuyéndola a ZT 12 ($p=0.01$). En la mitad del período de luz (ZT5) reprodujo lo observado a ZT 22 ($p=0.0001$), mientras que en la mitad del período de oscuridad no hubo ningún efecto. El análisis de ritmos no mostró cambios a ZT12. Sin embargo, a ZT22 se evidenció un aumento significativo en el mesor ($p=0.01$), a pesar de una única inyección. Esta es la primera vez que se demuestra un efecto diferencial del LPS dependiendo del momento de la aplicación y el compromiso de los NSQ en los cambios inducidos por una sustancia inmunológicamente activa.

ONCOLOGÍA 2: MARCADORES Y PROGRESIÓN TUMORAL

- 760. (6755) PARTICIPACIÓN DE GALECTINA-1 EN DIFERENTES ESTADIOS DE LA PROGRESIÓN TUMORAL.** RUBINSTEIN, NATALIA; PALEARI, LAURA; ANFOSSO, LUCA; TOSCANO, MARTA A.; ILARREGUI, JUAN M; BIANCO, GERMAN; ALBINI, ADRIANA; RABINOVICH, GABRIEL A

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas «José de San Martín», Facultad de Medicina, UBA, Laboratorio de Oncología Molecolare, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Génova, Italia.

Las células neoplásicas desarrollan diversas estrategias a lo largo de la progresión tumoral que les permiten sobrevivir bajo circunstancias desfavorables como anoxia, falta de nutrientes, espacios reducidos e inmunovigilancia. Recientemente hemos demostrado in vivo que células de melanoma secretan Galectina-1 (Gal-1) con el fin de evadir la respuesta inmune antitumoral a través de la inducción de apoptosis de linfocitos T activados. El objetivo del siguiente trabajo fue explorar la relevancia de Gal-1 en diferentes etapas de la progresión tumoral: angiogénesis, migración e invasión. Para evaluar las propiedades pro-angiogénicas de Gal-1, ratones C57/BL fueron inoculados (s.c.) con matrigel conteniendo Gal-1 recombinante (0.1-1µg/ml) en presencia o ausencia de tiodigalactósido (30mM) o anticuerpos específicos (1/50 ó 1/100). Luego de 5 días Gal-1 fue capaz de inducir angiogénesis en forma dosis dependiente y este efecto fue bloqueado por sus antagonistas. Estos resultados se correlacionan con los niveles de hemoglobina (Gal-1 Vs antagonistas, $p < 0.001$). Para explorar la capacidad de Gal-1 de modular la invasión y migración seleccionamos líneas tumorales humanas con altos niveles de expresión de Gal-1: sarcoma de Kaposi (KS) y carcinoma de mama (MDA). Estas líneas fueron transfectadas con siRNA o vector antisentido para bloquear la expresión de Gal-1. La eficiencia de bloqueo se analizó mediante Western blot. Los ensayos de invasión fueron realizados en cámaras conteniendo matrigel (12µg) y los de migración fueron realizados en soportes adecuados para cada línea (colágeno IV (5µg) para MDA y gelatina (5µg/ml) para KS). Los niveles de migración e invasión de KS-si y MDA-si disminuyeron significativamente al silenciar la expresión de Gal-1 ($p < 0.05$ KSsi vs KSw; $p < 0.05$ MDA-si vs MDA). Sumado a su participación en fenómenos de escape tumoral, el presente estudio sugiere la relevancia biológica de Gal-1 en diferentes eventos de la progresión tumoral.

- 761. (6837) COMPARTIMENTALIZACION DE CICLINA E EN CANCER DE PROSTATA.** SACCA, PAULA; CASAS, GABRIEL (1); MEISS, ROBERTO (2); MAZZA, OSVALDO (1); BATLLE, ALCIRA ; VAZQUEZ, ELBA (3)

CIPYP-CONICET, (1) Hospital Alemán, (2) Academia Nacional de Medicina, (3) Depto Química Biológica, FCEN-UBA

La división celular es controlada por complejos formados por ciclinas y Cdks que activan la transcripción. La ciclina E/Cdk2 controla la transición crítica de la fase G1 a S. La expresión de ciclina E muestra un patrón nucleoplásmico durante la mitad de G1 y se localiza en nucleolo en la transición de G1 a S. En carcinomas de próstata (PCa) se detectaron niveles altos de ciclina E, equiparando la actividad constitutivamente alta de Cdk2, anulando los mecanismos de control y conduciendo a un continuo ciclar de las células. En cáncer de vejiga la proteína fue identificada en el nucleolo, sugiriendo que la ciclina E no es exportada al citoplasma para su degradación. En PCa el sistema de gradación microscópica de Gleason se correlaciona con la estadificación clínico-patológica, las metástasis ganglionares y óseas y con las tasas de mortalidad. Se realizó un análisis inmunohistoquímico de ciclina E en muestras de pacientes con PCa. (n=29) e hiperplasia benigna (BHP, n=10). Se utilizó un Ab

policlonal anti ciclina E y un segundo Ab biotinilado. La reacción se visualizó usando streptavidina-biotina peroxidasa y DAB. Se consideraron positivos los casos con marcación nuclear de ciclina E mayor al 5% de las células; la presencia de marcación en nucleolo se clasificó como positivo. Se encontró marcación nuclear positiva de ciclina E en 8/15 (53%) pacientes con Gleason <7; en 4/7 (57%) con Gleason =7 y 5/7 (71%) con Gleason >7 ($p < 0.05$ vs grupos con Gleason menor o igual a 7). La marcación en nucleolo mostró el siguiente patrón: 6/15 (40%) pacientes con Gleason <7; en 4/7 (57%) con Gleason =7 y 5/7 (71%) con Gleason >7 ($p < 0.05$ vs grupos con Gleason menor o igual a 7). En los casos de BHP no se detectó ciclina E positivo ni en núcleo ni en nucleolo. Estos datos sugieren una correlación entre la acumulación de ciclina E nuclear y el grado de malignidad en PCa. Estos hallazgos pueden tener implicancias biológicas y terapéuticas que merecen un futuro análisis.

- 762. (6981) HEPATOCARCINOGENESIS E HIPERPLASIA REGENERATIVA. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL CICLO CELULAR Y ESTRÉS OXIDATIVO.** CASTRONUOVO, CYNTHIA CELESTE; SACCA, PAULA (1); CABALLERO, FABIANA (1); MEISS, ROBERTO (2); BATLLE, ALCIRA (1); VAZQUEZ, ELBA

Depto Química Biológica-FCEN-UBA, (1) CIPYP-CONICET, (2) Academia Nacional de Medicina

La progresión del ciclo celular es controlada por ciclinas y CDKs que son reguladas por sus respectivos inhibidores. La Hemo Oxigenasa 1 (HO1) se induce por varios estímulos, mantiene la homeostasis celular y es un indicador del nivel de estrés celular. El objetivo de este trabajo ha sido analizar en hiperplasia regenerativa (HR) por privación del carcinógeno la interrelación entre estrés y ciclo celular. Se utilizaron ratones macho que recibieron p-dimetilaminoazobenceno (DAB, 5% p/p) en la dieta durante 78 días más 11 días de dieta estándar (grupo HR) y se comparó con un grupo con hepatocarcinogénesis (grupo HC) inducida por administración continua de DAB (89 días). Los controles recibieron dieta estándar. Los niveles hepáticos de las proteínas ciclina E, CDK2, CDK4, p21 y HO1 se estudiaron por Western Blot. La morfología se estudió por histología convencional y la expresión tisular de HO1 con la técnica de biotina-streptavidina-fosfatasa alcalina utilizando un Ab policlonal anti-HO1. El grupo HC mostró: necrosis sin expresión de HO1; aumento de HO1 en células regenerativas y normales perinecroticas; hiperplasia de macrófagos hepáticos con incremento de HO1 y focos de alteración hepatocitaria con disminución de HO1. El grupo HR presentó: focos de regeneración con expresión de HO1 similar al grupo control normal y ausencia de necrosis. La expresión de CDK2 se mantuvo dentro de los valores controles en HC, aumentando 50% ($p < 0.05$) en HR. La alteración provocada por DAB en la expresión de ciclina E y CDK4 no se modificó en HR. La inducción de p21 (35%, $p < 0.05$) y HO1 (100%, $p < 0.05$) en HC se revirtió completamente en HR, indicando que el retiro del carcinógeno dietario favorecería la regeneración del hígado y restauraría la homeostasis hepática. La desregulación del ciclo celular, característica del proceso tumoral, se restablece parcialmente durante la HR.

- 763. (7355) EL TGF β1 LIBERADO POR HEPATOCITOS PRENEOPLÁSICOS CULTIVADOS CON INTERFERON ALFA-2B (IFN) MODIFICA LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES DE LOS MISMOS.** QUIROGA, ARIEL; ALVAREZ, M. DE LUJAN; RONCO, M. TERESA; PARODY, J. P.; FRANCES, D; MONTI, J.; OCHOA, E.; CARNOVALE, C.; CARRILLO, M. CRISTINA

Instituto De Fisiología Experimental (CONICET) Fac. De Cs. Bioq. Y Farm. UNR. Suipacha 570. Rosario.

El IFN induce apoptosis in vitro en hepatocitos de hígados preneoplásicos a través de un mecanismo mediado por TGF β1 producido por los propios hepatocitos. También se ha demostrado

que la apoptosis en cultivos de hepatocitos de hígados normales tratados con TGF β 1 se inicia por un aumento en las especies reactivas al oxígeno (ROS). Nuestro objetivo fue evaluar la producción de ROS y el estado de las defensas antioxidantes (contenido de GSH total y oxidado, actividad CAT y SOD) en cultivos de hepatocitos preneoplásicos tratados con IFN. Los animales fueron sometidos a un modelo de preneoplasia experimental y los hepatocitos fueron cultivados a distintos tiempos (1, 3, 7, 20 y 24 hs): a) en ausencia de IFN, b) estimulados con IFN. Sólo a la primera hora de cultivo se observó un aumento significativo de ROS ante el estímulo con IFN (sin IFN=100%, con IFN=141 \pm 7%*). IFN disminuyó el contenido de GSH total a partir de la hora 7 (sin IFN=100%, 7hs con IFN= 50 \pm 6%*; 20hs con IFN= 40 \pm 9%* y 24hs con IFN= 20 \pm 8%). No se observaron modificaciones en los niveles de GSSG. La actividad CAT no se vio modificada a ninguno de los tiempos estudiados. La actividad SOD comenzó a disminuir a partir de las 7 horas (sin IFN= 100%, 7hs con IFN= 35 \pm 7%*, 20hs con IFN= 15 \pm 10%, 24hs con IFN= 60 \pm 8%*; *p<0.05 con respecto al basal). Se realizaron los mismos experimentos en presencia de ácido ascórbico (Vit C) y de difenil-fenil-endiamina (DPPD). Los antioxidantes previnieron el aumento de ROS y la disminución de la actividad SOD, pero no modificaron el contenido de GSH total. El aumento de ROS, inducido por TGF β 1 en la primera hora de cultivo de hepatocitos preneoplásicos, sería una causa directa de la disminución de la actividad de SOD, mientras que los niveles de GSH total no estarían afectados por este aumento de ROS, sugiriendo la participación de otro mediador a determinar, en esta alteración.

764. (7375) REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE UN LINFOMA MURINO POR MG132 Y CAPE. GREZANIK, SOFIA; CAVALIERE, VICTORIA; PAPADEMTRIO, DANIELA; GARCÍA, MARIANA; ALANIZ, LAURA; HAJOS, SILVIA; ALVAREZ, ELIDA

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-IDEHU

El linfoma LB es un desorden linfoproliferativo T murino caracterizado por su alto grado de invasividad y baja inmunogenicidad. Previamente demostramos que existe una activación constitutiva del factor de transcripción NF κ B que se revierte por BAY11-7082. El objetivo de este trabajo fue analizar si el bloque de otros puntos en la vía de activación de NF κ B, usando inhibidores selectivos, altera la sobrevida celular. Se utilizó MG132, inhibidor del proteosoma 26S y CAPE, inhibidor de la actividad transcripcional de NF κ B. Por la técnica de EMSA, se verificó el máximo efecto inhibitorio con MG132 1 μ M y CAPE 50 μ g/ml tanto en el tumor primario como en la línea derivada LB02. El tratamiento de LB y LB02 con MG 132 (>0.5 μ M) y CAPE (>1.56 μ g/ml) durante 24 hs, produjo inhibición de la proliferación medida por incorporación de timidina tritiada. Los valores máximos hallados con CAPE 25 μ g/ml fueron 98,7 \pm 1.4% (p<0.001) y 97.3 \pm 3.5% (p<0.001) y con MG132 2 μ M 97.1 \pm 0.9% (p<0.001) y 96.9 \pm 1.5% (p<0.001) para LB y LB02 respectivamente. Cuando se correlacionó este efecto con la inducción de apoptosis, se encontró que MG 132 2 μ M fue capaz de producir efecto desde las 6 hs (% de apoptosis 17.7 \pm 5.7 (ns) y 30.6 \pm 6.54 (p<0.001)) con un máximo a las 24 hs (% apoptosis 95.6 \pm 3.9 (p<0.001) y 95.3 \pm 2.5 (p<0.001)) para LB y LB02. Así mismo, con CAPE 25 μ g/ml a las 6 horas se obtuvo un porcentaje de apoptosis de 21.6 \pm 0.7 (p<0.001) y 22.1 \pm 1.5 (p<0.001) y a las 24 horas 90.7 \pm 3.8 (p<0.001) y 74.6 \pm 6.9 (p<0.001) para LB y LB02. Al combinar MG132 1 μ M con CAPE 3.12 o 6.25 μ g/ml no se evidenció acción sinérgica entre ambas drogas. Concluimos que es posible modular el nivel de NF κ B en las células LB utilizando inhibidores selectivos de su activación; tanto MG132 como CAPE produjeron disminución de la capacidad proliferativa e indujeron apoptosis celular. Sin embargo el tratamiento combinado no logró potenciar la acción de estas drogas.

765. (7397) LA SOBREENPRESION DE LAS ISOFORMAS B1 Y E DE PKC INDUCEN DIFERENTES RESPUESTAS EN

CÉLULAS NORMALES Y TUMORALES. GROSSONI, VALERIA; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA; URTREGER, ALEJANDRO

Instituto de Oncología «Angel H. Roffo»

Previamente demostramos que la sobreexpresión de diferentes isoformas de PKC en células mamarias murinas normales indujo alteraciones compatibles con un fenotipo maligno. En este trabajo comparamos el efecto de la sobreexpresión de las isoformas clásica PKC β 1 y novel PKC ϵ en células mamarias murinas normales (NMuMG) y tumorales (LM3). A pesar de que la sobreexpresión de PKC β 1 en la línea tumoral LM3 indujo un aumento de su capacidad proliferativa in vitro tanto en monocapa, como en baja densidad (clonogenicidad 38,07 \pm 15,2% vs 19,13 \pm 7,5% en LM3-vector, p<0.05), se observó una significativa reducción en su capacidad tumorigénica (toma tumoral 35 \pm 10% vs 85 \pm 21% en LM3-vector, p<0,05) y metastásica (14% vs 57% en LM3-vector, p<0,05) en ratones singéneos. Este comportamiento in vivo se asoció con una inhibición de la secreción de uroquinasa (2 \pm 0,9 vs 37 \pm 15 UI/mg/24hs en LM3-vector, p<0,05), así como con la re-expresión de fibrillas extracelulares de fibronectina (FN). En cambio, en el contexto de las células normales NMuMG, la sobreexpresión de la misma PKC β 1 redujo 5 veces la capacidad clonogénica (p<0,05), pero, similar a lo observado en LM3, PKC β 1 también aumentó la expresión de FN. En cuanto a la isoforma novel PKC ϵ , en ambos contextos normal y tumoral, su sobreexpresión incrementó la capacidad de crecer independientemente del anclaje, una propiedad muy relacionada con el fenotipo maligno. Las proteinasas no fueron moduladas por la sobreexpresión de PKC ϵ en NMuMG ni en las células tumorales mamarias LM3. Sin embargo, los ratones inoculados con las células LM3-PKC ϵ presentaron una mayor incidencia (100% vs 57% en LM3-vector, p<0,05) y tamaño de metástasis pulmonares espontáneas que los inoculados con LM3-vector. Nuestros resultados sugieren que PKC β 1 tendría funciones supresoras de la transformación maligna y de la progresión tumoral, mientras que PKC ϵ sería promotora de ambos procesos en células mamarias.

766. (7410) EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA SOBREENPRESIÓN DE RECEPTORES DE ÉSTERES DE FORBOL (PE) EN UNA LÍNEA DE CARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO HUMANO. MAURO, L; GROSSONI, V; URTREGER, A; YANG, C; KAZANIETZ, M; BAL DE KIER JOFFÉ, E; PURICELLI, L

Instituto de Oncología «Angel H. Roffo», Center for Experimental Therapeutics, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA.

Los PE son promotores tumorales activadores de proteínas de la familia de serina-treonina quinasas PKC, transductoras de señales y capaces de controlar proliferación y transformación maligna. Últimamente se caracterizaron otras familias de receptores de PE, carentes de dominios quinasa, como la Beta-2 Quimerina (B2Chi). Esta tiene actividad Rac-GAP (GTPase Activating Protein) e inhibe funciones de Rac, como la proliferación, migración y progresión tumoral. Nuestro objetivo fue sobreexpresar la isoforma novel d de PKC y B2Chi en la línea de carcinoma pancreático PANC-1 y analizar algunas propiedades in vitro asociadas con el comportamiento tumoral. Las células PANC-1 fueron infectadas con multiplicidades de infección crecientes (0-100 pfu/cél) de un adenovirus con B2Chi incorporada y con LacZ como control. Se observó una reducción significativa de la tasa de crecimiento debido a la infección con B2Chi (2 veces con 10 pfu/cél), una marcada inhibición en la formación de colonias en agar blando y una menor expresión de los niveles de Ciclina D1, sin modulación de la CDK1 p16 (WB). Por otro lado, la sobreexpresión estable de PKC d no moduló la capacidad proliferativa de las células PANC-1, redujo la formación de fibras stress y aumentó la adhesión celular, respecto de las células control transfectadas con el vector vacío. Nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de diferentes receptores

PE induce diferentes cambios biológicos en las células tumorales PANC-1. Mientras la B2Chi inhibe la mitogénesis, la PKC δ no modula proliferación, aunque induce cambios en el citoesqueleto y adhesión celular.

767. (7656) EL COMPORTAMIENTO MALIGNO DE LA LÍNEA TUMORAL MAMARIA LM38-RB SE ASOCIA CON UNA MENOR SUSCEPTIBILIDAD A ESTÍMULOS CITOTÓXICOS Y UNA MAYOR CAPACIDAD PROANGIOGÉNICA.
KRASNAPOLSKI, MARTIN; BAL DE KIER JOFFE, ELISA; EIJAN, ANA MARIA

Instituto de Oncología «Angel H. Roffo»

El adenocarcinoma papilífero mamario murino M38 formado por células epiteliales lumbales (LEP) y mioepiteliales (MEP) es metastásico en pulmón y ganglio drenante. Por cultivo se generaron las líneas: LM38-RB (formada por MEP y LEP), LM38-RA (principalmente células epiteloides ahusadas) y LM38-D2 (clon MEP). Inoculadas en ratones BALB/c, LM38-RB se comporta como el tumor parental, mientras que LM38-RA y LM38-D2 forman tumores que poseen un crecimiento más lento y una disminución de la capacidad metastásica. Para estudiar los mecanismos implicados en ese comportamiento biológico diferencial estudiamos: 1-la angiogénesis in vivo evaluando número de vasos/mm² a los 5 días post inoculación de 4 x 10⁵ células /ratón, 2-la producción de óxido nítrico (NO) determinada mediante el reactivo de Griess y 3- la sensibilidad a la privación de suero o estímulos citotóxicos mediante la determinación de la actividad metabólica con MTS. Observamos que LM38-RB es más angiogénica (p<0.05) que LM38-RA y similar a la LM38-D2 (0.85+/-0.14; 0.63+/- 0.05 y 0.80+/-0.21 respectivamente). LM38-RB en condiciones basales produce mayores niveles de NO que LM38-RA y LM38-D2 (4 uM vs 2uM, error < 20%, p<0.05). Las células LM38-RA fueron más sensibles al tratamiento con doxorubicina 4uM que las LM38-RB (60 +/- 7% vs 40+/-6% de muerte a las 24 h de tratamiento), mientras que LM38-D2 fue resistente. Resultados similares se observaron con la privación de suero. Por otro lado todas las líneas fueron resistentes al nitroprusiato de sodio (dador de NO) hasta 0.6 uM durante 24h. El comportamiento más maligno de la línea LM38-RB podría atribuirse a su menor sensibilidad a estímulos citotóxicos y a su mayor capacidad angiogénica, posiblemente relacionada a la mayor producción de NO.

768. (7668) CITOTOXICIDAD DEL ÁCIDO ETACRÍNICO (EA) EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HÍGADOS PRENEOPLÁSICOS DE RATA. PARODY, JUAN PABLO; ALVAREZ, M. DE LUJAN; QUIROGA, ARIEL; RONCO, M. TERESA; FRANCES, DANIEL; MONTI, JUAN; OCHOA, ELENA; CARNOVALE, CRISTINA; CARRILLO, M. CRISTINA

Instituto De Fisiología Experimental (CONICET). Fac. De Cs. Bioq. Y Farm. UNR. Suipacha 570. Rosario

El EA es una droga que causa hepatotoxicidad y, junto con su conjugado con glutathione, es un inhibidor de las glutathione S-transferasas (GSTs) mediante unión covalente. Por otra parte, es sabido que ratas sometidas a un modelo biestadío de carcinogénesis experimental (iniciación-promoción, IP) presentan inducción de la isoenzima GST pi, que no está presente en ratas control (C). El objetivo del presente trabajo fue determinar diferencias en la respuesta de hepatocitos provenientes de animales C e IP ante el EA. Para ello, se obtuvieron hepatocitos aislados de dichos animales, los cuales fueron cultivados durante distintos tiempos (30, 60 y 120 min): a) en ausencia de EA, b) con distintas concentraciones de EA (0,1; 0,5 y 1,0 mM). Se observó una disminución significativa de la viabilidad en animales C tanto a los 60 min (sin EA=78±1%; 0,5 mM EA=65±4%; 1,0 mM EA=60±3%*) como a los 120 min (sin EA=56±3%; 0,5mM EA=37±4%; 1,0 mM EA=30±1%*). Sin embargo, la viabilidad en animales IP sólo se vio afectada a los 120 min y con 1,0 mM de EA (sin EA=72±1%; 1,0 mM EA=29±17%*)(* p<0,05). En concordancia con estos datos, la liberación de LDH y GPT al medio de

cultivo es menor para animales IP que para los C ante los efectos tóxicos del EA. Mediante estudios de Western blot se vio una inducción de la isoenzima GST pi en animales IP, la cual no se encontró en animales C. En conclusión, el mayor nivel de GST pi presente en los hepatocitos de animales IP y su capacidad de unirse al EA, sería el factor responsable de conferir un mecanismo de resistencia ante la presencia de este tóxico.

769. (8022) ACCION DE LA HISTAMINA SOBRE LA ADHESION Y MIGRACION CELULAR EN UNA LINEA DE CARCINOMA PANCREATICO HUMANO. CRICCO, GRACIELA; NUÑEZ, MARIEL; MEDINA, VANINA; GARBARINO, GLORIA; MOHAMAD, NORA; GUTIERREZ, ALICIA; COCCA, CLAUDIA; BERGOC, ROSA; RIVERA, ELENA; MARTIN, GABRIELA

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

La progresión de tumores epiteliales al estado metastásico se caracteriza por un aumento de la motilidad, disminución de la adhesión celular, elevada expresión y activación de metaloproteasas (MMP) y capacidad para inducir angiogénesis. En la línea celular de carcinoma pancreático humano PANC-1 la histamina (HA) actúa como factor de crecimiento modulando la proliferación mediante receptores H1 y H2 en forma diferencial. El objetivo de este trabajo es estudiar la acción de HA sobre la adhesión y migración celular y expresión de MMP en esa línea celular. Para el estudio de adhesión celular se utilizó la tinción con azul de metileno de células fijadas con formaldehído a distintos tiempos entre 30 y 90 min después de la siembra. Las células habían sido previamente tratadas por 48 hs. Se observó una disminución de la adhesión al plástico para todos los tiempos. A 90 min: Control 100%, HA 10 µM = 63%, HA 10 nM = 44%, ANOVA, p<0.01. Para la migración celular se utilizó la técnica de herida en monocapa. Se evaluó la expresión de PCNA por citometría de flujo para descartar división celular. Los estudios indicaron un aumento de la motilidad en los cultivos tratados con HA 10 nM a las 24 hs mientras que no hubo diferencia en la expresión de PCNA entre tratados y controles. Las actividades de MMP-2 y MMP-9 se determinaron por zimografía. La intensidad de las bandas gelatinolíticas se cuantificó mediante un software y los resultados se expresaron como porcentaje de las respectivas bandas del control. Se observó un aumento en la forma activa de la MMP-2 en los sobrenadantes de cultivos tratados con HA 10 nM (130% vs Control 100%, Test de Student, p<0.05). Estos resultados señalan a la HA exógena como un posible factor involucrado en la progresión tumoral hacia la metástasis en la línea celular PANC-1.

ONCOLOGÍA 3: TERAPÉUTICA

770. (6720) LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL XENOESTRÓGENO BISFENOL A: ¿MODULA LA ACCIÓN DE UN CARCINÓGENO QUÍMICO SOBRE LA GLÁNDULA MAMARIA? DURANDO, MILENA; KASS, LAURA; PIVA, JULIO; LUQUE, ENRIQUE H; MUÑOZ DE TORO, MÓNICA

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

El sostenido incremento en la incidencia de cáncer de mama coincide con la creciente utilización de químicos estrogénicos que contaminan el medio ambiente. Estudios epidemiológicos, sin embargo, no han logrado demostrar una indiscutible relación causa-efecto. Nuestro objetivo fue investigar si la exposición prenatal a bisfenol A (BPA), xenoestrógeno usado en la manufactura de plásticos, resinas epoxi y selladores dentales, modifica la sensibilidad de la glándula mamaria al carcinógeno químico, nitrosometilurea (NMU). Ratas Wistar preñadas recibieron (desde día 8 hasta el parto) BPA (25 µg/kg/día) o vehículo (V). Las crías hembras fueron tratadas, a los 50 días (50d) de edad, con 25 mg/kg de NMU (V+25NMU; BPA+25NMU). Otro grupo de

crías, a los 50d recibió 50 mg/kg de NMU (V+50NMU) y se usaron como control positivo. En la glándula mamaria se evaluó actividad proliferativa y apoptosis, infiltración de mastocitos, proliferaciones intraductales (PIDs) a los 110d y 180d e incidencia tumoral a los 180d. La mayor sensibilidad al NMU, de los animales expuestos prenatalmente a BPA, se evidenció por el aumento de: a) la relación proliferación/apoptosis en parénquima y estroma a los 110d, b) PIDs a los 110d (V+25NMU 6,5±1,2 vs BPA+25NMU 13,6±2,9) y 180d (V+25NMU 15,7±1,2 vs BPA+25NMU 34,8±4,0), c) la infiltración de mastocitos a los 110d (V+25NMU 0,4±0,02 vs BPA+25NMU 0,6±0,15), d) la incidencia de tumores a los 180d [V+25NMU 0% (0/11) vs BPA+25NMU 20% (3/15)]. En el control positivo (V+50NMU), 8/10 animales desarrollaron tumores mamaros a los 180d. La exposición prenatal a BPA, en concentraciones semejantes a las descritas en el ambiente, aumenta la sensibilidad de la glándula mamaria a un carcinógeno químico promoviendo el mayor desarrollo de lesiones neoplásicas.

771. (7032) EFECTO DE LA LONIDAMINA SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR HT-29. FUCHS, ALICIA GRACIELA

INSERM U180, Paris, Francia y CIBIERG Fac de Medicina, UBA-CONICET

La Lonidamina (LND) {1-[2,4-diclorofenil metil]-1H indazol - 3- ácido carboxílico} es propuesta como antineoplásica. Afecta el metabolismo de la glucosa y la hexoquinasa mitocondrial, el poro de permeabilidad transitoria y la adenina nucleotídico translocasa. Causa apoptosis en células HT-29 a 0.4 mM. Objetivo Estudio del efecto de la LND (0.2mM) sobre el crecimiento de la línea celular de un adenocarcinoma colónico humano- HT-29. Métodos Crecimiento en cultivo estándar y en agar -formación de colonias. Se estudió la incorporación de ^3H timidina al ADN y la síntesis proteica por la incorporación de ^3H Leucina a las proteínas y ^3H Uridina al ARN. Incorporación de ^3H glucosa a la célula y al glucógeno. Los Controles (Cn) fueron células tratadas con DMSO 0.6% y células en condiciones Estándar (St) de cultivo. Los resultados de 3 experimentos independientes expresados en Media \pm SD se evaluaron por análisis de la varianza. Resultados La LND disminuyó a) el tiempo de duplicación celular LND: 64 h ($p < 0.01$), Cn 37 h y St 24 h. b) la formación de colonias en agar ($p < 0.05$)- LND (0,23 \pm 0,56), Cn 18,04 \pm 3,61 y St 34,73 \pm 9,78. La interrupción de la LND restituye la formación de colonias 64,77 \pm 16,86 ($p < 0.001$) versus LND- 0,23 \pm 0,15, Cn HT-29: 17.12 \pm 4.24. La incorporación de timidina al ADN fue 31% en LND-HT-29, Cn 83%; St 100%. La síntesis de proteínas no se modificó significativamente por el tratamiento: Leucina/Uridina 21.95 \pm 1.11; 24.42 \pm 1.70 y 17.13 \pm 1.21 (cpm/ μg .prot.), LND, Cn y St respectivamente. No se modificó la captación de glucosa: LND: 24810 \pm 2,66; Cn 21380 \pm 2,74 y St 33150 \pm 3,76 (cpm/mg Prot.), ni la incorporación de glucosa al glucógeno (cpm) 48010; 37.489 y 44525- LND, Cn y St- valores del día 4 LND y 6 para las Cn y St. Conclusión La LND disminuye reversiblemente el crecimiento de las células HT-29 in vitro. Su efecto prolongaría la fase G1 o inhibiría la fase S del ciclo celular sin modificar la entrada de la glucosa a la célula y ni su incorporación al glucógeno.

772. (7071) ACTIVIDAD DE AGONISTAS DE RECEPTORES ACTIVADORES DE LA PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS (PPAR) SOBRE EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE VEJIGA. LODILLINSKY, CATALINA; SANDES, EDUARDO O.; MAGENTA, GABRIELA; UMEREZ, MARIA SOL; JASNIS, MARIA ADELA; CASABE, ALBERTO; EIJÁN, ANA MARIA

Instituto de Oncología Angel H. Roffo - UBA - Buenos Aires - Argentina.

Introducción: La activación de receptores nucleares PPARgamma (PPARg) induce diferenciación o inhibición del crecimiento de células tumorales. Su función en la biología del cán-

cer de vejiga (CV) es poco conocida, pero se ha sugerido que la activación de estos receptores puede ser una nueva posibilidad terapéutica. Objetivo: Estudiar si los ligandos de PPARg modifican la actividad antitumoral de la BCG (tratamiento convencional) en células de CV. Materiales y métodos: Células CV humanas T24 y murinas MB49 se tratan in vitro con el agonista sintético rosiglitazona (RO) y el agonista natural 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandina (PGJ-2) en presencia BCG, se determina la expresión de PPARg (inmunofluorescencia), la viabilidad (MTS) y la apoptosis (naranja de acridina). In vivo se evalúa el efecto del tratamiento oral con RO (7mg/kg), sobre el crecimiento sc de 5x10(5) células MB49 en ratones C57BL. Significación estadística ANOVA/ Bonferroni. Resultados in vitro: BCG induce la expresión de PPARg. El crecimiento de células T24 es significativamente inhibido por RO 100mM (70%inh) y por PGJ-2 100, 10 y 0.1 mM (70, 60 y 40% respectivamente) ($p < 0.001$). Las células MB49 son menos susceptibles: RO 100 mM (20% inh) y PGJ-2 100, 1 y 0.1 mM (30%, 25% y 20% respectivamente $p < 0.05$). in vivo: la RO estimula el crecimiento de células MB49, sólo (control: 0.63 \pm 0.24 mm, RO: 1.6 \pm 0.41 mm, $p < 0.05$) o en combinación con BCG (BCG: 0.3 \pm 0.12 mm vs RO+BCG: 0.80 \pm 0.6 mm, $p < 0.05$). Por inmunohistoquímica observamos que el tumor presenta infiltrado de linfomonocitos con alta expresión de PPAR g. Así aunque la activación PPAR g inhibe el crecimiento de células de cáncer de vejiga in vitro, in vivo se observa un efecto opuesto, posiblemente por desactivación de células efectoras inmunes, haciendo aún incierta la utilización de estos compuestos en el tratamiento del cáncer de vejiga.

773. (7105) LA INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) IN VIVO MEJORA LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON BACILO CALMETTE GUERÍN (BCG) EN CÁNCER DE VEJIGA (CV). ALVARO, VALERIA GISELLE; MASCOTTO, LETICIA; TROVERO, ALICIA; ARGÜELLES, CLAUDIA; SANDES, EDUARDO; CASABÉ, ALBERTO; EIJÁN, ANA MARÍA

Instituto de Oncología Angel H. Roffo - UBA - Buenos Aires - Argentina. A.N.L.I.S. Dr Carlos G Malbrán - Buenos Aires - Argentina.

La BCG es una inmunoterapia efectiva para el carcinoma in situ y el superficial de alto grado, induciendo una respuesta inmune efectora y producción de NO. Sin embargo, demostramos que 1) pacientes con CV que expresan iNOS (enzima productora de NO) en epitelio vesical tienen mayor índice de recurrencia (Sandes E, et al, Medicina 63:582, 2003), 2) el NO inducido por BCG en células de CV mata células inmunocompetentes in vitro. Nuestro objetivo es estudiar si la inhibición de la producción de NO in vivo, mejora la respuesta al tratamiento con BCG. Ratones C57BL inoculados sc con 5x10(5) células MB49 (CV murino), se dividieron en 4 grupos: control, L-NAME (inhibidor de la producción de NO) 0.2 g/kg ratón vía oral, BCG intratumoral 8x10(6) UFC/ratón/0.1 ml, dos veces por semana o la combinación de ambos. Ambos tratamientos se iniciaron a las 24 hs o a los 5 días post trasplante. El tamaño tumoral se expresa como promedio \pm DS cm(3) (n), análisis estadístico ANOVA/ Bonferroni. Cuando los tratamientos se inician a las 24hs, todos inhiben el crecimiento tumoral ($p < 0.001$, n=7)(control: 4.5 \pm 0.8, L-NAME: 1.0 \pm 0.7, BCG: 0.2 \pm 0.09, BCG+L-NAME: 0.1 \pm 0.09, (35 días de evolución). Cuando se inician a los 5 días, se observa que ya a los 4 días, el tamaño tumoral es menor en el grupo tratado con L-NAME+BCG ($p < 0.05$, n=10) (control: 0.2 \pm 0.08, L-NAME: 0.15 \pm 0.09, BCG: 0.15 \pm 0.07, BCG+L-NAME: 0.1 \pm 0.04). Mediante coloración tricrómica de Mason observamos que los tratamientos inducen un aumento de fibras colágenas siendo mas evidente con el tratamiento BCG+L-NAME. Nuestros resultados indican que la inhibición de la producción de NO, no sólo disminuye el crecimiento tumoral sino que mejora la respuesta a BCG, induciendo un tejido fibrótico de reemplazo.

774. (7248) ACCIÓN ANTITUMORAL DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA EMPLEANDO UN DERIVADO DE

FTALOCIANINAS: ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.
YSLAS, EDITH INES; BERTUZZI, MABEL; CABRAL, ANA;
DURANTINI, EDGARDO; RIVAROLA, VIVIANA

Universidad Nac. de Río cuarto, Dpto Biología Molecular, Fisiología Animal, Química FCEFYQn, Dpto Patología Animal FAYV. U.N.R.C

La terapia fotodinámica es una nueva modalidad terapéutica contra el cáncer. Este tratamiento se basa en la acumulación del fotosensibilizador en el tejido tumoral y su subsiguiente iluminación con la longitud de onda específica, en presencia de oxígeno. Las ftalocianinas generan oxígeno singlete, toxicidad insignificante en ausencia de luz, alta retención en el tejido tumoral y absorben en rangos de longitud de onda=600–700nm. Los objetivos del presente trabajo son el estudio de Zinc(II) 2,9,16,23-tetra(metoxi)ftalocianina (ZnPcOCH₃) en la línea celular de laringo carcinoma humano (Hep-2) y en ratones balb/c. Los ensayos de viabilidad celular en oscuridad (MTT) nos ha permitido determinar que a entre concentraciones 0,1-0,5 μ M de ZnPcOCH₃ no se vio afectada la supervivencia celular. Sin embargo, la acción combinada de ZnPcOCH₃ y luz visible induce una disminución del 80% de la viabilidad celular. Una dosis de irradiación de 44 J/cm² produjo predominantemente una morfología de muerte de tipo apoptótica (Hoechst 33258). Los estudios de localización celular indicaron que dicha droga se ubica en lisosoma. Los estudios farmacocinéticos en ratones Balb-c indicaron que ZnPcOCH₃ se acumula preferencialmente en hígado y bazo, mientras que los valores encontrados en cerebro y piel fueron insignificantes. Por análisis histopatológico (H.E) se observó ausencia de alteraciones relevantes en hígado bazo y riñón. En lo que se refiere a los estudios fototerapéuticos se determinó el volumen de tumores tratados con ZnPcOCH₃ e irradiados. Se encontró una regresión significativa del 50% del volumen 10 días post-TFD. Por análisis inmunohistoquímico se encontró expresión de caspasa-3 24 h posteriores al tratamiento. En conclusión ZnPcOCH₃ es un interesante fotosensibilizador para la TFD, debido su capacidad de inducir regresión en el volumen de los tumores y ausencia de toxicidad in vivo.

775. (7650) PROMOCIÓN TUMORAL MAMARIA POR TÓXICOS TIPO DIOXINA: ACCIÓN SOBRE LOS RECEPTORES DE FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINA-SÍMIL TIPO I (RIGF-I) Y SRC-QUINASA. CARBONE, VERÓNICA MARÍA; COCCA, CLAUDIA (2); NÚÑEZ, MARIEL (2); FRAHM, ISABEL (3); PENA, MARÍA (3); BERGOC, ROSA (2); KLEIMAN, DIANA (1); RANDI, ANDREA (1)

(1) *Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.* (2) *Laboratorio de Radioisótopos, Fac de Farmacia y Bioquímica* (3) *Serv Patología, Mater Dei*

El Hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental "tipo dioxina" que altera el sistema endocrino e inmunológico. Se une al Receptor de Hidrocarburos Aromáticos complejoado con la Src-quinasa y puede activar receptores de factores de crecimiento y la transcripción de genes. Demostramos que el HCB promueve el crecimiento tumoral e incrementa la fosforilación del Receptor de Insulina en tumores mamarios en ratas. Objetivos: Estudiar si el HCB induce proliferación celular y/o cambios histológicos de tumores o glándula mamaria en ratas, los niveles de RIGF-I y de Src en tumores y en la línea celular MCF-7. Metodología: 4 grupos de ratas: vehículo(V), HCB(100mg/kg), NMU(50mg/kg+V) y NMU-HCB(50mg/kg+100mg/kg). Las células se expusieron 24 horas a etanol o HCB(0,005;0,05y0,5 μ M). Microsomas y lisados celulares totales se usaron para determinar RIGF-I y Src por inmunoblot. Cortes de tejidos fueron preparados para estudios histológicos. Resultados: el grupo NMU-HCB presentó mayor incidencia tumoral (66%vs100%; p<0.05). Nro de tumores/rata (NMU:3,87±0,58y NMU-HCB: 5,67±1,18;p<0.05) y volumen tumoral (NMU:3,46±0,9y NMU-HCB: 14,56±5,03cm³; p<0.001). El patrón histológico de los tumores NMU-HCB fue cribiforme, con mayor índice mitótico, infiltrado inflamatorio y

número de mastocitos, y menor grado de diferenciación que NMU; en glándula mamaria el HCB produjo hiperplasia lobulillar de conductos. En células, el tóxico estimuló la proliferación (HCB[0.05]:456%;p<0.001). El HCB elevó los niveles de RIGF-I en mama (407%; p<0.01) y los disminuyó en tumores (653%;p<0.01) y en células MCF-7 (HCB[0.05]: 22%;p<0.05). La expresión de Src aumentó en mama (HCB:380%;p<0.01), en tumores (NMU-HCB:1300%;p<0.001) y en células (HCB[0.05]:32%;p<0.05). El HCB promueve la carcinogénesis mamaria, estimula la proliferación celular in vivo e in vitro y altera los niveles de RIGF-I y de la proteína Src.

776. (7665) EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2 EN CÉLULAS DE UN ADENOCARCINOMA DE PULMÓN MURINO. PELUFFO, GUILLERMO DANIEL; URTREGER, ALEJANDRO; DIAMENT, MIRIAM; KLEIN, SLOBODANKA

Departamento Bioterio y Cáncer Experimental, área Investigación, IOAHR. Departamento Biología Celular, Área Investigación, IOAHR

Los AINEs ejercerían su efecto antitumoral principalmente por inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX2), sobreexpresada en distintos tumores humanos y murinos. Síndromes paraneoplásicos como caquexia y leucocitosis se presentan acompañando diversos tumores. Tales síndromes se observan en portadores del tumor de pulmón murino LP07. El tratamiento de portadores LP07 con el AINE celecoxib (cxb) redujo el crecimiento del tumor primario (556±68 vs 1101±44mm³, P<0.001) y el nº de metástasis pulmonares (8.8±2.3 vs 27.1±4.2, P<0.001); inhibiendo la pérdida de peso corporal (-1.1±3.2 vs 10.5±1.4% del peso inicial, P<0.01). La inhibición en la expresión de COX2 por transfección de las células LP07 con un vector que codifica para su ARNm anti-sentido (AS) no produjo el mismo efecto in vivo que el uso de cxb, en cuanto a crecimiento tumoral como desarrollo de metástasis y caquexia. La inhibición de la expresión de COX-2 en las células transfectadas con el vector AS fue confirmada por WB. La inhibición de la expresión de COX2 aumentó la sensibilidad de las células LP07 al cxb, reduciendo su viabilidad a las 24h (50uM, 80.5% vs 88.2% del control, P<0.01) y 48h (10uM, 88.9% vs. 104.3%, P<0.01.) de tratamiento. La actividad de uPA secretado al medio condicionado se redujo tanto con el tratamiento con cxb 10uM (1.60±0.19 vs. 2.93±0.35UI/mg el control, P<0.01) como con la inhibición de la expresión de COX2 por transfección con el vector AS (1.98±0.12UI/mg, P<0.05). La actividad de MMP-9 en medios condicionados de células transfectadas con el vector anti-sentido también disminuyó con respecto al control (0.53±0.07 vs. 1.73±.32UA/mg, P<0.05) así como también en las tratadas con cxb 10uM (1.29±0.22UA/mg, P<0.05). Estos resultados indicarían que aunque la inhibición de la actividad de proteasas in vitro estaría mediada por la expresión de COX2 en las células tumorales, no es el único blanco necesario para mediar los efectos antitumorales de los AINEs in vivo, pudiendo serlo la COX2 de células estromales.

777. (7677) RADIOSENSIBILIDAD DE CÉLULAS DE CARCINOMA PANCREÁTICO. ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO. MOHAMAD, NORA¹; MEDINA, VANINA¹; NÚÑEZ, MARIEL¹; COCCA, CLAUDIA¹; MARTÍN, GABRIELA¹; CROCI, MÁXIMO²; CRICCO, GRACIELA¹; RIVERA, ELENA¹; BERGOC, ROSA¹

(1) *Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA* (2) *Instituto de Inmunooncología Dr. Ernesto Crescenti*

El objetivo de este trabajo fue determinar los parámetros de radiosensibilidad in vitro de la línea celular PANC-1, derivada de carcinoma pancreático humano, y la respuesta in vivo a la radiación ionizante de tumores desarrollados al inocular sc dichas células en ratones nude. Asimismo, se evaluó el posible efecto radioprotector del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). Estudio in vitro. La radiosensibilidad se evaluó por ensayo clonogénico, con un rango de dosis de 0 a 10 Gy. Los parámetros

de radiosensibilidad a α y β se determinaron mediante las curvas de sobrevida ajustadas al modelo lineal cuadrático, obteniéndose $0,53 \pm 0,09$ Gy⁻¹ y $0,18 \pm 0,03$ Gy⁻¹, respectivamente. El agregado de 20 ng/ml de IGF-1 no modificó el valor de los parámetros. Estudios in vivo. La radiosensibilidad se evaluó en tumores inducidos desarrollados en ratones nude. Los tumores se irradiaron localmente con 1,5 Gy/día durante 20 días mediante un generador de rayos X. Se observó una significativa disminución en la velocidad de crecimiento tumoral respecto a controles sin irradiar ($p=0,021$). La radioprotección a tejidos sanos por IGF-1 se evaluó por administración sc de 2,5 μ g/0,1ml dos veces por día durante 4 días a ratones nude, irradiándose cuerpo entero del ratón con 10 Gy en el día 2 y comparándose los cortes de intestino con los de controles que recibieron vehículo. El grupo tratado presentó un mayor número de criptas intestinales/0,5cm (140 vs 85) y menor grado de atrofia, respecto del grupo sin tratar. Se están llevando a cabo estudios moleculares para elucidar los mecanismos de respuesta a la radiación ionizante en varios tipos celulares malignos. El ensayo clonogénico de células Panc-1 mostró que el IGF-1 no modificó los parámetros de radiosensibilidad. Los tumores inducidos con células Panc-1 en ratones nude resultaron ser sensibles a la irradiación localizada. El IGF-1 resultó ser radioprotector del intestino delgado al irradiar ratones nude.

778. (77579 EFECTO ANTITUMORAL DE LA ROSIGLITAZONA. NÚÑEZ, MARIEL¹; MARTÍN, GABRIELA¹; COCCA, CLAUDIA¹; CRICCO, GRACIELA¹; MOHAMAD, NORA¹; GUTIÉRREZ, ALICIA¹; MEDINA, VANINA¹; KIRCHHEIMER, CAROLINA¹; RIVERA, ELENA¹; BERGOC, ROSA²

Lab. de Radioisótopos, FFyB, UBA, IUCS, FUNDACIÓN BARCELÓ

El objetivo de este trabajo fue estudiar el posible efecto antitumoral de la rosiglitazona (Rosi), en comparación con el antiestrógeno tamoxifeno (Tam), y la combinación Rosi+Tam, tanto in vivo como in vitro. Los estudios in vivo se realizaron sobre lotes de ratas Sprague-Dawley portadoras de tumores mamarios inducidos por inyección del carcinógeno N-Nitroso-N-Metilurea. Las administraciones de Rosi (0,06 mg/kg/día-oral), Tam (1 mg/kg/día-sc) y Rosi+Tam, se iniciaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 0,6 cm de diámetro. Al cabo de 30 días de tratamiento los resultados mostraron una regresión tumoral del: 45, 55 y 75%, respectivamente, para Rosi, Tam y Rosi+Tam ($P<0,0001$ vs Control sin tratamiento, ANOVA de dos criterios y Tukey a posteriori). Los estudios in vitro se efectuaron empleando líneas celulares de carcinoma mamario humano: MCF-7 y MDA-MB-231. El efecto de Rosi y Tam sobre la proliferación celular se ensayó mediante recuento clonogénico, observándose en ambas líneas celulares una inhibición dosis dependiente (MCF-7, CE50 = 20 μ M y 0,4 μ M; MDA-MB-231, CE50 = 30 μ M y 5 μ M, para Rosi y Tam, respectivamente). En la línea MCF-7 el tratamiento combinado Rosi+Tam produjo una inhibición de la proliferación significativamente mayor que cada tratamiento por separado (Rosi+Tam 31% vs Rosi 20 μ M 50%, $P<0,001$; Rosi+Tam 31% vs Tam 0,5 μ M 43%, $P<0,01$; ANOVA de un criterio). El análisis del ciclo celular (citometría de flujo) demostró que la Rosi produce un arresto del ciclo en G0/G1 en ambas líneas celulares. Estos resultados abren una perspectiva interesante para continuar con los estudios del empleo de una droga normalmente utilizada para el tratamiento de la diabetes tipo 2, como lo es la rosiglitazona como posible terapia antitumoral, sola o en combinación con tamoxifeno.

779. (7767) LA HISTAMINA MODULA SELECTIVAMENTE LA RESPUESTA A LA RADIACION IONIZANTE. MEDINA, VANINA; GARBARINO, GLORIA; CRICCO, GRACIELA; MOHAMAD, NORA; CROCI, MAXIMO; NÚÑEZ, MARIEL; MARTIN, GABRIELA; BERGOC, ROSA; RIVERA, ELENA

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

En este trabajo se investigó la acción de la histamina (HA) frente al daño oxidativo producido por la radiación ionizante (RI). En los estudios in vitro distintas líneas celulares se trataron con HA 10mM desde 20 hs antes de ser irradiadas con dosis de 0 a 10 Gy. Las curvas se ajustaron según el modelo lineal cuadrático. Los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) se midieron por citometría de flujo con colorantes fluorescentes y la actividad de Superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) se determinó por técnicas espectrofotométricas. El efecto in vivo de la HA se estudió en ratones nude, 5 tratados con HA (0,1 mg/kg/día vía sc) y 5 controles, todos irradiados en cuerpo entero con 10 Gy y sacrificados al 5to día. La HA aumentó significativamente la radiosensibilidad de la línea MDA-MB-231 (Ca. mama) disminuyendo la fracción de sobrevida a 2Gy ($0,27 \pm 0,04$ vs $0,09 \pm 0,04$, $p<0,001$). Este efecto se correlacionó con un aumento del H₂O₂ (180%) y cambios en la actividad de SOD (370 ± 12 vs 162 ± 9 U/mg.prot) y de CAT (18 ± 2 vs $5,3 \pm 0,3$ U/mg.prot). La HA no modificó la radioresistencia de la línea WM35 (melanoma) aunque sí moduló la producción de ROS. In vivo la HA produjo un efecto radioprotector. El intestino de los ratones tratados mostró ausencia de edema y mayor n° de criptas intestinales (132 ± 9 vs 85 ± 5 n°/0,5 cm). La inmuno marcación para PCNA resultó positiva en células basales mientras que se observaron muy escasas células apoptóticas (Apoptag) en las criptas y vellosidades intestinales. En forma similar la médula ósea del grupo tratado con HA mostró menor grado de aplasia con conservación de megacariocitos y elementos mieloides en contraste con el control. Estos datos indican que la HA frente a altas dosis de RI, ejerce un efecto protector selectivo en tejidos normales no observado en células transformadas y que esta respuesta se debe en parte a la capacidad de modular la producción de ROS.

REPRODUCCIÓN 3

780. (6637) MODULACIÓN DE LA SÍNTESIS LIPÍDICA POR ÓXIDO NÍTRICO EN TEJIDO PLACENTARIO DE RATA SANA Y DIABÉTICA. WHITE, VERÓNICA; CAPOBIANCO, EVANGELINA; PUSTOVRH, CAROLINA; MARTINEZ, NORA; HIGA, ROMINA; GONZÁLEZ, ELIDA; JAWEBBAUM, ALICIA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos

Nuestros estudios previos indican alteraciones en el metabolismo lipídico y en el sistema nitridérgico durante la gesta diabética. Objetivo: Evaluar en tejido placentario de rata sana (C) y diabética por estreptozotocina (D) el metabolismo lipídico, un posible efecto modulador de NO sobre dicho metabolismo, y la presencia de peroxinitritos. Metodología: Tejido placentario (día 21 de gesta) se incubó durante 3 h en presencia del trazador (14)C-Acetato de Sodio, sin adiciones simultáneas o con el agregado de a) un inhibidor de la enzima NO sintasa (NMMA 600 μ M) o b) de un dador de NO, Nitroprusiato de Sodio (NP 300 μ M). La posterior evaluación del metabolismo lipídico se realiza por TLC y revelado, con posterior cuantificación en contador de centelleo líquido en el caso de la síntesis lipídica de novo. Se evidencia la nitrosilación proteica, índice del daño inducido por peroxinitritos mediante inmunohistoquímica. Resultados: El tejido placentario de ratas diabéticas muestra mayor nitrosilación proteica que el tejido de animales sanos. En las ratas diabéticas se observa una disminución en la síntesis de fosfolípidos (PL) (48% $p<0,01$) y de triglicéridos (TG) (50% $p<0,01$) con respecto al control. El bloqueo de la generación endógena de NO produce una disminución en la síntesis de PL: (C: 75% $p<0,01$) (D: 60% $p<0,05$) TG: (C: 98% $p<0,001$) (D: 47% $p<0,001$) y Esteres de Colesterol (EC) (C: 63% $p<0,05$) (D: 75% $p<0,001$). El incremento de NO en el medio de incubación no modificó el metabolismo lipídico placentario en las especies estudiadas. Concluimos que el contenido endógeno de NO es capaz de regular la síntesis lipídica en el tejido placentario de rata, y que la diabetes materna induce alteraciones en el sistema nitridérgico placentario.

781. (6653) EFECTO DE 15D-PGJ2, ACTIVADOR ENDÓGENO DEL RECEPTOR PPAR-GAMMA, SOBRE LA ACTIVIDAD METALOPROTEÁSICA DURANTE EL DESARROLLO FETAL Y PLACENTARIO EN LA GESTA DIABÉTICA. 1,2 PUSTOVRH, CAROLINA ; 1 JAWERBAUM, ALICIA; 1 CAPOBIANCO , EVANGELINA; 1 WHITE , VERONICA; 1 MARTINEZ, NORA; 2 LÓPEZ-COSTA, JUAN JOSÉ; 1 GONZALEZ , ELIDA

1 Lab de Reproducción y Metabolismo, CEFYBO-CONICET; 2 IBCyN «Prof De Robertis» F.Medicina, UBA

Las metaloproteasas (MMPs) son enzimas proteolíticas involucradas en los procesos de remodelación tisular durante el desarrollo fetal y placentario, y sus niveles uterinos elevados han sido previamente relacionados con alteraciones en la gesta diabética. La activación del receptor nuclear PPARgamma está vinculada con el desarrollo fetal y placentario. Objetivo: Evaluar los niveles de 15deoxydeltaPGJ2 (15dPGJ2, agonista endógeno de PPARgamma), y la regulación de MMPs por 15dPGJ2 en el feto (F) y placenta (P) de ratas controles (C) y diabéticas (D) a mediados de la gesta. Metodología: La diabetes se indujo por administración neonatal de estreptozotocina (100mg/kg). Las MMPs fueron evaluadas por zimografía e inmunohistoquímica. Los niveles de 15dPGJ2 se dosaron por EIA. Resultados: Se observa un incremento en la expresión y actividad MMP2 (70%, 110% respectivamente, $p<0.01$) y MMP9 (180%, 31%, respectivamente $p<0.05$) en PD en relación al C. En el feto, sólo se detecta expresión y actividad de MMP2, mayores en el FD (63%, 27% respectivamente, $p<0.05$) que en el FC. En PC, la adición de 15dPGJ2 (2 μ M) inhibe la expresión de MMP2 en su forma latente (32%, $p<0.01$), aunque no su actividad; mientras que en la PD inhibe tanto la expresión como la actividad de las MMPs (31%, 70% respectivamente, $p<0.05$). En el feto 15dPGJ2 inhibe la expresión y la actividad MMP2 (FC: 25%, 30% respectivamente, $p<0.05$; FD: 47%, 38% respectivamente, $p<0.01$). Los niveles de 15dPGJ2 se encuentran disminuidos en PD y FD (92%, 71% respectivamente $p<0.01$) en relación al control. Existe una mayor actividad MMPs en la unidad fetoplacentaria de ratas diabéticas, alteración que podría deberse en parte a una disminución en los niveles de 15dPGJ2, capaz de inhibir la expresión y la actividad de MMPs.

782. (6673) INFLUENCIA DE 15-DEOXY-DELTA-PGJ2 (15D-PGJ2) SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN PLACENTAS DE RATAS SANAS Y DIABÉTICAS. CAPOBIANCO, EVANGELINA; JAWERBAUM, ALICIA; WHITE, VERÓNICA; PUSTOVRH, CAROLINA; MARTINEZ, NORA; HIGA, ROMINA; GONZALEZ, ELIDA

CEFYBO-CONICET

La diabetes es una patología caracterizada por desórdenes metabólicos. El receptor nuclear PPARgamma es un importante regulador del metabolismo lipídico. Nuestros estudios previos demuestran que los niveles placentarios de 15dPGJ2 (ligando natural de PPARgamma) son menores en placentas de ratas diabéticas que en animales sanos. Placentas a término de ratas sanas (C) y diabéticas (D) por administración neonatal de estreptozotocina fueron aisladas con el objeto de determinar los niveles de PPARgamma (inmunohistoquímica) y de evaluar los efectos de 15dPGJ2 (2 μ M) sobre el metabolismo lipídico (incorporación de acetato marcado a distintas especies lipídicas). Resultados: PPARgamma se expresa en el tejido placentario sano y diabético, siendo menor en la zona del laberinto de ratas D en relación al C. La adición de 15dPGJ2 no modificó la masa lipídica en la placenta de los grupos estudiados. Sin embargo la adición de 15dPGJ2 disminuyó la síntesis de triglicéridos (35%, $p<0.01$), ésteres de colesterol (55%, $p<0.05$) y fosfolípidos (32%, $p<0.01$) en placentas de ratas C, efecto que es dependiente de PPARgamma, ya que no se observa en presencia de un antagonista de dicho receptor nuclear. El efecto de 15dPGJ2 sobre la síntesis lipídica de novo no se detecta en la placenta D. La acti-

vación de PPARgamma por su agonista endógeno 15dPGJ2 modula el metabolismo lipídico placentario. Dicho efecto no se evidencia en la placenta diabética, probablemente debido a los bajos niveles de PPARgamma en este tejido, alteración que podría estar involucrado en la disfunción placentaria inducida por la patología diabética.

783. (6768) LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE LEPTINA ATENÚA LA ACCIÓN INHIBITORIA DE UNA SEVERA RESTRICCIÓN ALIMENTARIA SOBRE EL PROCESO OVULATORIO. ROMAN, ERNESTO; RICCI, ANALÍA; FALETTI, ALICIA

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 malas condiciones nutricionales. En este trabajo estudiamos el efecto de la administración crónica de leptina sobre la acción inhibitoria de una severa restricción alimentaria sobre el proceso ovulatorio. Se utilizaron 4 grupos de ratas de 21 días: dos de ellos con dieta alimentaria normal e inyectados (ip) con buffer (C) o leptina (L) (3 μ g/día) y los dos grupos restantes fueron sometidos a una restricción alimentaria del 70% (RA70) respecto a los controles a partir del día 25 e inyectadas con buffer (R) o leptina (R+L) como los grupos anteriores. A los 7 días de la restricción alimentaria todos los animales fueron tratados con eCG/hCG para inducir su primera ovulación. Se determinaron los pesos corporales diarios (Pc) en g, pesos ováricos (Pov) en mg, niveles de progesterona (Pg) y leptina (Lep) en ng/ml suero por RIA, tasa ovulatoria (Tov) en ovocitos/ovario y contenido ovárico de prostaglandina E preovulatoria (PGE) en μ g/mg tejido por RIA. Los resultados obtenidos figuran en el cuadro adjunto (* $p<0.05$ y ** $p<0.01$ vs C; # $p<0.05$ y ## $p<0.01$ vs R).

	Pc	Pov	Tov	Pg	Lep	PGE
C	64±8	41±3	27±1	34±3	0.25±0.02	397±44
L	62±7	41±4	34±2**	50±3*		562±58
R	36±2**	21±2**	2±1**	21±3*	indetectable	198±10*
R+L	36±1**	32±3#	9±1#	39±9#		513±95##

Estos resultados indican que el tratamiento crónico con leptina es capaz de revertir parcialmente la acción inhibitoria de una severa restricción alimentaria sobre el proceso ovulatorio de la rata, al menos en parte, por una acción sobre la producción ovárica de prostaglandinas preovulatorias.

784. (6781) MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EN EMBRIONES DE RATA SANA Y DIABÉTICA DURANTE LA ORGANOGÉNESIS TEMPRANA. HIGA, ROMINA; JAWERBAUM, ALICIA; WHITE, VERÓNICA; CAPOBIANCO, EVANGELINA; PUSTOVRH, CAROLINA; MARTINEZ, NORA; GONZALEZ, ELIDA

Laboratorio de Reproducción y Metabolismo-CEFYBO-CONICET

Trabajos previos mostraron niveles incrementados de NO en el embrión de rata diabética durante la organogénesis. Objetivo: evaluar en el embrión de rata sana (EC) y diabética (ED) la formación de peroxinitritos y la regulación de la producción de NO por vitamina E (antioxidante) y 15deoxydelta12,14PGJ2 (15dPGJ2, agonista endógeno de PPARgamma, con efectos anti-inflamatorios). Metodología: La diabetes se induce por administración de estreptozotocina 60 mg/kg previo al apareo. Se obtienen embriones de día 11 de gesta tratadas o no durante la preñez con vitamina E (400 mg/día). Se evalúa la presencia de residuos de nitrotirosina (inmunohistoquímica). Se dosan los niveles de nitratos/nitritos según Griess (índice de la producción de NO) cultivados durante 3 h sin adiciones o en presencia de 15dPGJ2 2 μ M. Se determinan los niveles de 15dPGJ2 (EIA).

Resultados: A diferencia de lo que ocurre en EC, los ED presentan inmunoreactividad para nitrotirosina, índice del daño inducido por peroxinitritos. Los niveles de nitratos/nitritos, elevados en ED en relación a EC (146%, $p < 0.001$), no se modifican por el tratamiento con vitamina E. La adición de 15dPGJ2 disminuye la producción de NO en los EC (43%, $p < 0.01$), mientras que no la modifica en los ED. Los niveles de 15dPGJ2 son menores en los ED (89%, $p < 0.001$) en relación a los EC. En los ED existen elevados niveles de NO y de peroxinitritos. El tratamiento con vitamina E no modifica la producción de NO embrionaria. En los EC, 15dPGJ2 regula negativamente los niveles de NO. Sin embargo en los ED, dicho prostanoido no sólo se encuentra en concentraciones disminuidas, sino que además no es capaz de regular los niveles de NO, alteraciones probablemente vinculadas con los mayores niveles de NO embrionarios y la aparición de malformaciones congénitas.

785. (7089) ESTUDIOS DEL GEN DE LA INHIBINA-ALFA (INH-ALFA) EN PACIENTES CON FALLA OVÁRICA PREMATURA (POF). SUNDBLAD, VICTORIA; CHIAUZZI, VIOLETA; CHARREAU, EDUARDO; DAIN, LILIANA

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

La falla ovárica prematura (POF) es un síndrome heterogéneo de etiología desconocida en muchos casos. 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. Se estudió el gen INH-alfa como posible causante de POF idiopático. Se analizó el polimorfismo C129T de la región 5'UTR y la mutación G913A (G769A) del exón 2, en ADNs provenientes de 49 pacientes con POF (POF idiopático (PI) $n=37$; POF autoinmune (PA) $n=12$) y 122 controles (C) ($C < 40$ años: $n=73$, mujeres con ciclos regulares, sin antecedentes familiares de POF ni de enfermedades autoinmunes, 29 de ellas con fertilidad comprobada; $C > 40$ años: $n=49$, sin menopausia precoz y con fertilidad comprobada). Las regiones de interés fueron amplificadas por PCR y los fragmentos fueron digeridos con Spel, y Fnu4HI y/o BsrFI, respectivamente. Las frecuencias alélicas halladas para C129T fueron: $C < 40$ años: 0.836 C y 0.164 T; $C > 40$ años: 0.695 C y 0.305 T; PI: 0.757 C y 0.243 T; PA: 0.750 C y 0.250 T. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo control y PI en el riesgo de desarrollo de POF (OR[< 40]= 1.61 IC[95%]: 0.76-3.38; OR[> 40]= 0.73 IC[95%]: 0.34-1.58). La mutación del exón 2 fue hallada en: 1/37 PI, 0/12 PA, 6/73 $C < 40$ años y 1/49 $C > 40$ años. La presencia de la mutación G913A es descrita en este trabajo por primera vez en un número significativo de individuos controles, sugiriendo la necesidad de esclarecer si esta sustitución afecta la funcionalidad de la proteína y/o está involucrada en la etiopatología de POF. Asimismo, no hemos observado una asociación entre el polimorfismo C129T y el riesgo de desarrollo de POF. Por lo tanto, a diferencia de lo descrito por otros autores en dos trabajos previos, nuestros resultados no estarían indicando una asociación entre el gen de INH-alfa y la ocurrencia de POF idiopático.

786. (7125) ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO EN LIQUIDO FOLICULAR DE PACIENTES PERTENECIENTES A UN PROGRAMA DE FERTILIZACION ASISTIDA. BUZZI, JACQUELINE; PINTOS, LAURA (1); BECONI, MARTHA (1); QUINTANA, RAMIRO; YOUNG, EDGARDO; CETICA, PABLO (1)

Instituto de Ginecología y Fertilidad, Química Biológica, Fac. Cs. Veterinarias, UBA

La alta concentración de especies reactivas del oxígeno (ROS) es una de las principales causas de daño celular, aunque una producción controlada sería necesaria para funciones fisiológicas. El objetivo fue determinar los niveles de ROS en flui-

do folicular (FF) periovulatorio de pacientes sometidas a hiperestimulación ovárica controlada y su relación con el grupo etario, niveles de hormonas sexuales y respuesta ovárica. Se evaluaron muestras de FF de pacientes con factor masculino como causa de infertilidad, clasificándolas en 3 grupos: Jóvenes (J) 23-31 años, Mediana Edad (M) 34-38 años y Añosas (A) 39-42 años. Se utilizó el mismo protocolo de inducción, análogos de GnRH y gonadotrofinas urinarias (300 UI/día). La determinación de ROS se realizó por espectrofluorometría en alícuotas de FF incubadas por 1 hora con diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína. Los valores de ROS se expresaron en Unidades Arbitrarias de ROS/ μ l. Los niveles de estradiol, testosterona, androstenediona y progesterona de cada muestra de FF se midieron por quimioluminiscencia. La respuesta ovárica se determinó en base al n° total de folículos y ovocitos en metafase II por paciente. Se observaron mayores niveles de ROS en FF proveniente de J (0,93 \pm 0,13) respecto a A (0,50 \pm 0,09) ($P < 0,05$), manteniendo un valor intermedio M (0,73 \pm 0,17). El n° de folículos ováricos (J 15,3 \pm 3,0; M 9,3 \pm 3,5; A 3,6 \pm 0,5) y de ovocitos en metafase II (J 11,6 \pm 2,9; M 7,3 \pm 3,2; A 2,8 \pm 0,4) por paciente, variaron de la misma forma ($P < 0,05$). No se observaron diferencias significativas en los niveles de estradiol, progesterona, testosterona y androstenediona entre los grupos etarios. El porcentaje de embarazo fue 50%, 33% y 0% para J, M y A, respectivamente. Se detectaron niveles de ROS en el FF periovulatorio humano que descienden con el aumento de la edad y la disminución de la respuesta ovárica. Determinados niveles de ROS podrían estar asociados a una mejor funcionalidad ovárica y/o folicular.

787. (7383) EFECTO DE LOS ANÁLOGOS DE GNRH SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA APOPTOSIS MEDIADA POR FAS EN CULTIVOS DE CÉLULAS ENDOMETRIALES DE PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS (EDT). BILOTAS, M (1); BARAÑO, R (1); BUQUET, R (2); SUELDO, C (3); TESONE, M (1); MERESMAN, G (1)

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Bs. As. Argentina, (2) Servicio de Ginecología Hospital de Clínicas, Bs. As. Argentina; (3) Cegyr, Bs. As. Argentina

Basándonos en trabajos previos que indican que los antagonistas de GnRH (GnRHant) pueden inducir apoptosis y/o inhibir la proliferación celular en otros sistemas y en estudios nuestros que muestran que los agonistas de GnRH (GnRHag) inducen apoptosis en células epiteliales endometriales (CEE) nos propusimos investigar: a) El efecto de los GnRHant de sobre la proliferación celular y la apoptosis en las CEE y b) El efecto de los GnRHag y ant sobre la expresión de las proteínas proapoptóticas Fas y FasL. Se realizaron cultivos primarios de CEE partiendo de biopsias de endometrio de pacientes con EDT y controles (sin EDT). Se estimularon con Antide (A) como GnRHant, 10(-7)M, 10(-6)M y 10(-5)M, se evaluó el porcentaje de células apoptóticas por la técnica de naranja de acridina y bromuro de etidio y se estimó la proliferación celular por incorporación de (3)H-timidina. Por otro lado las CEE se estimularon con Acetato de Leuprolide (LA) 1000ng/ml como GnRHag, A 10(-5)M y A+LA y se evaluó la expresión de Fas y FasL por western blot. El análisis estadístico se hizo por el test de Kruskal Wallis y el test de Dunn. En los cultivos de CEE de pacientes con EDT se observó que el A inhibió la proliferación celular comparado con el basal 10(-7)M:-21 \pm 4%, $p < 0.05$; 10(-6)M:-32 \pm 8%, $p < 0.01$ y; 10(-5)M:-34 \pm 7%, $p < 0.001$). El porcentaje de células apoptóticas aumentó de 22 \pm 4% a 48 \pm 4% con A 10(-5)M ($p < 0.01$) mientras que con A 10(-7)M y 10(-6)M no se vieron diferencias significativas. El LA 1000ng/ml, el A 10(-5)M y el A+LA elevaron la expresión de FasL (61 \pm 13% y 121 \pm 52%, $p < 0.01$; 100 \pm 33%, $p < 0.001$ respectivamente vs. basal) pero no provocaron cambios significativos en la expresión de Fas. Se obtuvieron resultados similares en los cultivos de mujeres controles. Los GnRHant inhiben la proliferación celular e inducen la apoptosis en las CEE. El efecto proapoptótico ejercido por los GnRHag y ant estaría mediado por el sistema Fas/FasL.

788. (7391) EXPRESIÓN DE AROMATASA P450 EN LESIONES ENDOMETRÓICAS PERITONEALES (LEP).
BILOTAS, M (1); AUGE, L (2); BELLÓ, A (2); DOMENECH, L (2); BARAÑO, RI (1)

Instituto de Biología y Medicina Experimental – CONICET, (2) Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER)

La endometriosis (EDT) se define como presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Su desarrollo dependería de la actividad hormonal. Se ha demostrado que existe aromatasa P450 (aP450) en tumores uterinos y endometriales y que no existe en miometrio y endometrio eutópico normal. Además se ha observado que hay expresión de aP450 en endometrio de pacientes con EDT y en LEP. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de aP450 en LEP clasificadas como rojas o negras por imagen laparoscópica, y poder establecer si existen diferencias entre ambos tipos de lesiones. Se analizaron 14 biopsias de LEP, 8 rojas y 6 negras, con confirmación histológica de las mismas. Las biopsias se realizaron a pacientes menores de 38 años, que consultaron por infertilidad y dolor pélvico crónico. Durante la cirugía se efectuó la clasificación de las LEP y se tomaron las biopsias. La evaluación de aP450 se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico y el grado de intensidad de la tinción se expresó desde una marcación negativa (-) hasta altamente positiva (++++). Se observó que tanto en las LEP rojas como en las negras se tiñó el estroma, el epitelio glandular y el endotelio vascular. En ambos tipos de LEP la mayor tinción se observó en glándulas y vasos. Los resultados fueron en Ep. Glandular: LEP Rojas 62,5% de las muestras(++++), 12,5% (+++) y 25% (++) y en LEP negras: 50% (++++) y 50% (+++). En la fracción estromal de LEP rojas 37,5% (++++), 25% (+++) y 37,5% (++) . En las LEP negras el 16,6% fueron (+++), 66,6 % (++) y 16,6% (+). En las LEP rojas el estroma aparece más teñido que en las negras. Se observó expresión de aP450 en los diferentes tipos de LEP. La actividad de esta enzima favorecería la creación de un ambiente hiperestrogénico que permitiría mayor desarrollo y expansión de la enfermedad. De este modo, el tratamiento médico con inhibidores de aromatasa podría constituir una nueva alternativa terapéutica para las pacientes con endometriosis.

789. (7403) VEGF Y APOPTOSIS EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE PACIENTES ESTIMULADAS CON AGONISTAS O ANTAGONISTAS DE GNRH.
ROMANATO, M (1); VALCARCEL, A (2); BASCONI, V. (2); SYNN, M (3); BARAÑO, RI (1); SUELDO, C (3)

1. IBYME- CONICET, 2. IFER, 3. Univ. California- San Fco.- Fresno

Los primeros resultados de los estudios multicéntricos y multinacionales mostraron que el tratamiento con antagonistas de GnRh (Antg) en inducción de la ovulación en pacientes con fertilización asistida, producía una menor tasa de embarazo en comparación con los agonistas GnRh (Ag). En trabajos previos, nuestro grupo demostró que existe una relación inversa entre porcentaje de células apoptóticas (Cap) y niveles de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en cultivos de células de la granulosa (CG). El objetivo del presente estudio fue comparar los niveles de VEGF y los porcentajes de Cap de folículos estimulados con Antg o Ag en pacientes con buena respuesta ovárica. Se estudiaron 30 pacientes (< 40 años), 20 fueron tratadas con Antg y 10 con Ag en fase luteal. En ambos grupos se administró además FSH recombinante y HMG ó r-LH. Las CG se purificaron con gradiente de Percoll y se cultivaron 1x10(5) / pocillo por 48 horas. Los porcentajes de Cap se determinaron empleando naranja de acridina-bromuro de etidio y los niveles de VEGF se cuantificaron por ELISA. El análisis estadístico se realizó mediante el test "t" de Student y el de Bonferroni. Ambos grupos de pacientes tenían un promedio de edad semejante 34.3 ± 0.6 años en Antg y 33.8 ± 1.3 años en Ag. Los niveles de estradiol sérico en el primer día de HCG, el número y la calidad ovocitaria fueron también semejantes en ambos grupos 8.6 ± 1.2

Antg y 8.4 ± 2.3 Ag. La tasa de fertilización fue de 79.1% Antg y 82.5% Ag. Las concentraciones de VEGF fueron 16.5 ± 2.0 pg en Antg y 20.41 ± 3.2 pg en Ag. Los porcentajes de Cap fueron 44.3 ± 4.0% en Antg y 45.3 ± 5.2% en Ag. Ninguno de los parámetros evaluados mostró diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados demuestran que los cultivos de CG de pacientes de FIV tratadas tanto con GnRh Antg como con Ag presentan similar grado de Cap y concentraciones de VEGF, lo cual se refleja en semejante calidad ovocitaria y embrionaria.

790. (7441) OXIDO NÍTRICO (NO) Y PROSTAGLANDINAS (PGS) COMO MODULADORES DE REABSORCIÓN EMBIONARIA MURINA INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDO (LPS).
AISEMBERG, JULIETA (1); OGANDO, DIEGO (1); MEISS, ROBERTO (2); FRANCHI, ANA MARÍA (1)

(1) Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, (2) Academia Nacional de Medicina

Desarrollamos un modelo murino para estudiar el mecanismo del aborto séptico induciendo reabsorción embrionaria con LPS. En la preñez temprana, dosis relativamente bajas de LPS que reproducen la mayor parte de los efectos sistémicos y celulares de la sepsis, sin comprometer la supervivencia materna, producen altos porcentajes de reabsorción embrionaria. En los sitios implantatorios la inducción del aborto incrementa la síntesis de NO, siendo máxima 6 hs post-administración de endotoxina. En este modelo un inhibidor de la síntesis de NO, la aminoguanidina (AG) es capaz de revertir la reabsorción observada en un 58%. El objetivo del trabajo fue esclarecer la participación y las interacciones del NO y las PGs en nuestro modelo. Hembras Balb/c se trataron con LPS (0.5-1ug/g peso, ip) sólo o en simultáneo con AG, Indometacina (IM-inhibidor no selectivo de ciclooxigenasas), Meloxicam o NS-398 (selectivos para COX-2). Los animales fueron sacrificados a las 6 hs. Se incubó por separado decidua y útero. La IM (2.5 mg/Kg) y el Meloxicam (4 mg/Kg) revierten en un 90 y 87% respectivamente la reabsorción inducida por LPS. En los sitios de implantación el LPS produjo un aumento en los niveles de PGs ($p < 0.01$ / $p < 0.05$ según el tejido) que fue revertida en útero por la AG (6 mg/tratón, $p < 0.01$), y por la incubación con IM (10-6M, $p < 0.001$). En decidua la AG no fue capaz de bloquear el incremento de PGs debido a la endotoxina y la administración de AG en animales control incrementó la síntesis de prostanoides (4525±458 vs 6806±708 pg/mg p.h. para PGE2; 1454±300 vs 2384±158 pg/mg p.h. para PGF2a). El NS-398 revierte el incremento de PG F2a.. Estos resultados sugieren que en útero el aumento de PGs se produce principalmente vía NO-COX y en decidua el NO tendría un efecto inhibitorio sobre la síntesis de los prostanoides.

791. (7974) ROL DE LA LEPTINA EN EL DESARROLLO PUBERAL DE NIÑOS NORMALES Y OBESOS. RECABARREN, MARÍA DEL VALLE; PEREZ, NORA; SUESCUN, MARÍA OLGA

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, Hospital Dr Guillermo Rawson, San Juan, Laboratorio Orellano-Elorza, San Luis

Con el fin de evaluar si los estados de hiperleptinemia como la obesidad primaria influyen en el desarrollo puberal, se estudiaron 56 varones con edades entre 6.17 a 13.61 años; 25 con exceso de peso y 31 con peso normal. Se registró la talla, el peso y el volumen testicular. Se calculó el índice de masa corporal (Kg/m²) y según la distribución percentilar los niños se clasificaron en normopesos u obesos. De acuerdo al volumen testicular se consideraron prepúberes o púberes. En muestras de sangre se determinaron leptina y testosterona por radioinmunoensayo y LH y FSH por enzimoimmunoensayo fluorométrico. Los niños se agruparon en G1, prepúberes normopesos; G2, prepúberes obesos; G3, púberes normopesos y G4, púberes obesos. En tabla: a, b y c diferentes entre sí; $P < 0,05$. Se constató una correlación directa entre leptina e IMC ($r = 0,88$, $p < 0,001$) y leptina y talla ($r = 0,68$, $p < 0,001$) en todos los niños. En los grupos puberales

se observó una correlación inversa, no significativa, entre leptina y testosterona.

	G1 n=23	G2 n=14	G3 n=8	G4 n=11
Edad (años)	8.91± 0.33 a	9.36± 0.52 a	11.47± 0.23 b	11.13± 0.43 b
Talla (cm)	125.2± 1.75 a	139.7± 3.16 b	138.4± 3.07 b	155.8± 3.94 c
IMC (Kg/m ²)	15.73± 0.27 a	25.75± 1.46 b	18.04± 0.42 a	29.05± 1.73 b
Leptina (ng/mL)	3.30± 0.45 a	31.25± 5.69 b	6.47± 1.69 a	35.59± 5.11 b
Test. (ng/dL)	8.50± 1.34 a	8.05± 1.40 a	34.43± 14.06 b	58.17± 24.0 b
FSH (mUI/mL)	0.84± 0.15 a	0.54 ± 0.12 a	1.89± 0.41 b	2.40± 0.45 b
LH (mUI/mL)	ND	ND	1.08± 0.27	1.12± 0.44

Los niños púberes obesos evidenciaron mayor variabilidad interindividual en el desarrollo puberal, con estadíos de Tanner más avanzados. Sin embargo los resultados no permiten concluir que la hiperleptinemia, modifique el inicio de la pubertad en varones.

792. (7998) EVALUACIÓN IN-VITRO DE INHIBIDORES DE AROMATASA P-450 (INH-AROM) SOBRE LA APOPTOSIS Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR ENDOMETRIAL EN ENDOMETRIOSIS (EDT). MERESMAN, G (1); BILOTAS, M (1); ABELLO, V (1); BUQUET, R (2); TESONE, M (1); SUELDO, C (3)

(1) Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), (2) Servicio de Ginecología, Hospital de Clínicas, Bs. As., Argentina; (3) Cegyr, Bs. As., Argentina

Los inh-arom han sido últimamente propuestos como alternativa terapéutica para el tratamiento de la EDT. Basándonos en evidencias previas que demostraron una inhibición por parte de estos compuestos sobre el crecimiento tumoral in-vitro, nos propusimos evaluar el efecto de dos de los inh-arom más utilizados en la clínica, el letrozole (LET) y anastrozole (ANAS) sobre la apoptosis y la proliferación celular de cultivos de células endometriales epiteliales (CEE) de pacientes con EDT. Partiendo de biopsias de endometrio de 18 pacientes con EDT, se realizaron cultivos de CEE y luego de 48 hs, se agregaron distintas dosis de LET o ANAS. Se evaluó el porcentaje de células apoptóticas (%Apc) por el método de naranja de acridina-Br de etidio y el porcentaje de proliferación celular (%Pc) con respecto al basal por incorporación de (3)H-timidina. El tratamiento con LET 10 y 100nM indujo un incremento en el %Apc de 14.6±1.9% (basal) a 34.6±6.7% (p<0.05) y a 45.3±6.9% (p<0.001) respectivamente. Asimismo ANAS 100 y 500nM aumentaron el %Apc de 17.5±1.4% (basal) a 41.9±6.9% (p<0.05) y a 53.8±7.9% respectivamente. (p<0.001). Mientras que no se hallaron diferencias significativas luego del agregado de LET 1nM y ANAS 50nM: 21.3±3.3% y 31.0±2.9% (p>0.05 vs. basal). El %Pc se vio inhibido con LET 10 nM: 64.4±10.7% (p<0.05) y LET 100nM: 58.2±10.2% (p<0.001) mientras que LET 0.1 y 1nM no indujeron diferencias significativas: 102.3±6.9% y 99.7±9.1%, respectivamente. Asimismo ANAS 100 y 500nM inhibieron el %Pc: 47.3±9.7% y 36.0±7.2% (p<0.01 y p<0.001) mientras que dosis más bajas no produjeron efectos significativos: 89.8±7.1%; 73.5±9.6% y 65.0±9.9% para ANAS 1, 10 y 50nM respectivamente. (p>0.05, ns). Los inh-arom LET y ANAS indujeron un efecto positivo sobre el crecimiento endometrial in-vitro inhibiendo la proliferación celular e incrementando la apoptosis. Estos datos estarían insinuando que son drogas candidatas a ser evaluadas como alternativa terapéutica para la EDT.

REPRODUCCIÓN 4

793. (8069) ESTUDIO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DEL SISTEMA PROACROSINA/ACROSINA HUMANO. FALCINELLI, ANDREA; BIANCOTTI, JUAN CARLOS; DAIN, LILIANA; VAZQUEZ-LEVIN, MÓNICA

IBYME, CONICET-UBA, Buenos Aires, Argentina

Acrosina (EC 3.421.10) es una proteasa acrosomal espermática tipo tripsina que participa en la penetración de la

zona pellucida (ZP) durante la fecundación. Estudios de nuestro grupo mostraron que una disminución en la actividad enzimática de acrosina se asocia a infertilidad en pacientes con infertilidad sin causa aparente. Se realizaron estudios para determinar las bases moleculares de las alteraciones en la actividad enzimática de acrosina. Se evaluó 1) el patrón de activación de proacrosina en extractos proteicos espermáticos por Western immunoblotting, y 2) la secuencia nucleotídica codificante de sitios funcionales de proacrosina por secuenciación directa de productos de PCR. Los estudios bioquímicos revelaron alteraciones en el patrón de activación en todos los casos de actividad anormal (n=4), contrastando con perfiles normales en pacientes con actividad normal (n=8). No se encontraron cambios en la secuencia codificante de los aminoácidos del sitio activo, del sitio de unión al sustrato, de residuos cisteína (puentes S-S de relevancia estructural), y de algunos puntos de clivaje para la activación de proacrosina, entre otros. El análisis de secuenciación permitió identificar un punto de cambio en el triplete codificante de Tyr235, blanco de fosforilación de TK, y potencial regulador de la activación del zimógeno (A704-G; Tyr a Cys). Se identificaron otros tres puntos de cambio en los nucleótidos 528 (A528-G; Ile a Met), 593 (G593-A; Gly a Glu), y 829 (A829-G; Met a Val) del gen. Ambos alelos se encontraron en pacientes y controles. La existencia de una segunda copia truncada del gen en el genoma explicaría la presencia de estos alelos alternativos en tres casos, no así para el nucleótido 829. En conclusión, se encontraron alteraciones en la activación de proacrosina en individuos con actividad enzimática anormal, pero no se identificaron cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína. Se hallaron puntos polimórficos potenciales en los exones 4 y 5 del gen.

794. (6805) EXPRESIÓN DE CASPASAS EN EL CUERPO LÚTEO (CL) DEL CICLO NATURAL DE RATAS . PELUFFO, MARINA; BUSSMANN, LEONARDO; STOUFFER, RICHARD; TESONE, MARTA

IBYME, ONPRC-OHSU (Oregon National Primate Research Center-Oregon Health & Science University)

La apoptosis ha sido relacionada con la regresión del CL en distintas especies. Dado que los miembros de la familia de las caspasas juegan un papel central en la apoptosis se propuso estudiar en CL la expresión de algunas caspasas iniciadoras y/o efectoras (-2, -3, -8, -9) durante el ciclo natural de ratas. Los CLs tanto en estro como en diestro II fueron aislados bajo lupa separando los CLs del ciclo actual y ciclo anterior siguiendo un criterio de vascularización y de tamaño. Se midió la actividad de estas 4 caspasas en extractos proteicos utilizando una placa con sustrato fluorogénico inmovilizado específico para cada caspasa. Por otra parte, ovarios de animales en estro (E) y en diestro II (DII) (n=6-7) fueron fijados para realizar inmunohistoquímica (IHC) de caspasas -3 y -8. El peso de las 2 poblaciones de CLs tanto en E como en DII mostraron una diferencia significativa (E ciclo actual; recién formado: 3.91 ± 0.43 mg; E ciclo anterior, funcional: 11.31 ± 0.74 mg; DII ciclo actual: 12.24 ± 0.63 mg; DII ciclo anterior: 5.23 ± 0.44 mg; p<0.001). La IHC para caspasa-3 mostró una expresión diferencial en los CLs del ciclo actual con respecto al anterior. En E se observó una mayor intensidad de marca en los CLs del ciclo anterior en las células endoteliales y en las luteales pequeñas, mientras que en DII, la mayor intensidad de marca en estos tipos celulares se observó en los CLs del ciclo actual. Por otro lado, la intensidad de marca en las células luteales grandes permaneció constante. En el caso de la caspasa-8, su expresión fue menor y más pareja a lo largo del ciclo y en las 2 poblaciones de CLs. En los CLs del ciclo anterior, la actividad de las caspasas -2, -3 y -9 se encontró aumentada en E (1.39, 1.68 y 7.61 veces respectivamente; p<0.05); mientras que en CLs de DII no se obtuvieron diferencias significativas. La caspasa-8 no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos. Se concluye que las caspasas podrían tener un papel importante en la formación y regresión del CL.

795. (6807) EXPRESIÓN DINÁMICA DE LAS CASPASAS EN EL CUERPO LÚTEO (CL) DEL CICLO NATURAL DEL

MONO RHESUS. PELUFFO, MARINA; YOUNG, KELLY; STOFFER, RICHARD

IBYME, ONPRC-OHSU (Oregon National Primate Research Center-Oregon Health & Science University)

Las caspasas juegan un papel muy importante en la apoptosis. Nosotros proponemos que durante la formación y regresión del CL, las caspasas estarían involucradas en el proceso de reestructuración del mismo. Se recolectaron CL (n=3-4) de monas rhesus mediante una luteotomía en las distintas etapas de la fase luteal (Temprana, día 3 post LH: ECL; Media, día 7: MCL; Media-Tardía, día 10: MLCL; Tardía, día 14: LCL; Muy-Tardía, día 18: VLCL). Se realizó RT-PCR o Real Time PCR de caspasa-2, -3, -8 y -9. Se extrajeron proteínas para medir la actividad de las 4 caspasas utilizando una placa con sustrato fluorogénico específico para cada caspasa y para realizar una ELISA de la forma clivada de caspasa-3. Otras porciones del CL fueron fijadas para realizar inmunohistoquímica (IHC) para caspasa-2 y -3 para medir apoptosis utilizando la técnica de TUNEL. Los niveles del mRNA de las 4 caspasas no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los distintos estadios. Mientras que en la actividad, se observó un aumento de 2 a 10 veces en MLCL ($p < 0.05$). Interesantemente, los resultados del ELISA presentaron un patrón similar al de actividad, observándose un aumento de 2-58 veces de expresión de la forma clivada de caspasa-3 en MLCL ($p < 0.05$). En la IHC de caspasa-2 la marca se observó en las células granulosa-luteínicas, aumentando su intensidad y cantidad en LCL y VLCL. En el caso de la caspasa-3, se observó una abundante expresión durante la fase lútea, detectándose un aumento en MCL y la aparición de marca en el núcleo a partir de MCL. La marca se encontró en las células granulosa- y teca-luteínicas. Los resultados del TUNEL mostraron un aumento en el número de células apoptóticas a partir de MLCL en las células granulosa- y teca-luteínicas así como también en las células endoteliales. Se concluye que la apoptosis sería uno de los eventos tempranos en la regresión del CL de primates. Y que la regulación de las caspasas en el CL de primates sería a nivel de traducción y/o activación y no a nivel de transcripción.

796. (6812) REGULACIÓN DE ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE LA ENZIMA 17ALFA HIDROXILASA (CYP 17) POR UN AGONISTA DE GnRH. IRUSTA, GRISELDA; PARBORELL, FERNANDA; ABRAMOVICH, DALHIA; TESONE, MARTA
IBYME (CONICET)

Las células tecales, al ser estimuladas por LH, sintetizan andrógenos los cuales son utilizados por las células de la granulosa para la producción de estrógenos. En trabajos previos hemos demostrado que un agonista de GnRH (acetato de leuprolide, LA) inhibe el desarrollo folicular y aumenta la apoptosis en células de la granulosa. Nuestro objetivo fue determinar si además, existen alteraciones en la producción de andrógenos en folículos ováricos de ratas tratadas con LA. Para esto, se estimularon ratas prepúberes con gonadotropinas (PMSG), parte de las cuales fueron inyectadas sc con LA: 2ug/0.1ml/rata. Los animales fueron sacrificados a las 2, 8, 24 y 48 hs post tratamiento y se aislaron folículos antrales para la realización de Western blot y RT-PCR de la CYP 17. Además, se colectó suero para la medición de esteroides. Para los ensayos in vitro, se sacrificaron las ratas 48 hs luego del tratamiento con gonadotropinas, se aislaron los folículos antrales y se incubaron durante 8, 12, 24 y 48 hs con los siguientes estímulos: grupo control: FSH (20 ng/ml) y grupo LA: FSH (20ng/ml) + LA (100ng/ml). A los tiempos indicados, se extrajeron los esteroides del tejido para la medición de androsterona. LA produjo una disminución significativa ($p < 0.05$) en los niveles de androsterona sérica a las 8hs (C: 25.7±2.8 vs LA: 10.4±2.6 ng/ml) y 24 hs (C: 24.9±2 vs LA: 12.6±1.6 ng/ml) de tratamiento, como en los niveles proteicos de la CYP 17 a los mismos tiempos, 8hs (C: 5.7±0.82 vs LA: 3.2±0.26 unidades arbitrarias, UA) y 24hs (C: 4.37±0.52 vs LA: 2.31±0.41 UA). Este efecto también se produjo en los niveles de ARNm de esta enzima.

Estos resultados se correlacionan con ensayos in vitro, donde el agonista inhibió ($p < 0.05$) la producción de androsterona en folículos expuestos durante 24hs a LA (C: 581±79.7 vs LA: 285.6±94.7 ng/fol.) y 48hs (C: 457.7±76 vs LA: 207.3±63 ng/fol.). Concluimos que el GnRH sería un factor intraovárico, que inhibe la síntesis de la CYP 17 te cal y como consecuencia la producción de andrógenos.

797. (6912) ACTIVIDAD DE LAS METALOPROTEASAS MMP 2 Y MMP 9 EN LA PLACENTA DE RATAS BAJO LOS EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO. ROMANINI, MARIA CRISTINA; PUSTOVHR, CAROLINA²; PAZ, DANTE³; GONZALEZ, ELIDA²; SOÑEZ, CARLOS¹; MUGNAINI, MARIA¹; ROLANDO, ALICIA¹; PASTORINO, ISABEL¹; BOZZO, ANDREA¹; GAUNA, HECTOR F.

(1) Dpto. Anatomía Animal-F.A.V.-Universidad Nacional de Río Cuarto. (2) CEFyBO-CONICET; FCEN-UBA; FCEQyN-UNRC

Las metaloproteasas son enzimas que participan en la reestructuración y maduración de la placenta. En estudios previos, el óxido nítrico y los radicales libres de oxígeno producen la activación de la MMP2 y MMP9. Se estudiaron en ratas preñadas los efectos del estrés crónico sobre la actividad de las mismas en la placenta. Se usaron dos grupos de ratas Wistar en condiciones de bioterio controladas: control(C) y estresadas(E) por inmovilización intermitente, homotípica, intensa e impredecible. Se sacrificaron a los 12, 17 y 21 días de la gestación. Se evaluaron por zimografías realizadas en geles de poliacrilamida. Las bandas fueron cuantificadas con un programa analizador de imágenes (Sigma-gel), expresándose en unidades densitométricas arbitrarias. Hubo diferencias estadísticamente significativas de los valores medios (\pm SEM, $p < 0.05$) entre los grupos C y E, observándose un incremento de la actividad de MMP2 en el día 12 y de MMP9 en los días 17 y 21 de la preñez. El estrés crónico en las madres gestantes produce un aumento de la actividad colagenolítica de MMP2 en el comienzo del desarrollo de la placenta corioalantoidea. Estaría modulado por la acción conjunta de los ROL y NO que en bajos niveles activan la gelatinasa, lo que podría producir alteraciones en la angiogénesis y en la remodelación de la matriz extracelular, que se traduciría alterando estos procesos fisiológicos. El incremento de la MMP9 en los días 17 y 21 de la preñez en madres estresadas coincide con el aumento de los ROL, según nuestros estudios previos. Las variaciones de la actividad enzimática de ambas gelatinasas en la placenta de madres estresadas crónicamente produciría una mayor remodelación tisular basada en alteraciones de traducción de señales intercelulares y con la matriz extracelular, mecanismos que contribuirían al desarrollo de patologías placentarias y de partos a pre-término.

798. (6935) EFECTO DE MIFEPRISTONE (MP) Y NALOXONA (NAL) SOBRE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE PROLACTINA (PRL) AL FINAL DE LA PREÑEZ. ¹SOAJE, MARTA; ²MALDONADO, CRISTINA; ¹EZQUER, MARCELO; ¹DEIS, RICARDO

IMBECU, ²Centro de Microscopía Electrónica. UNCbA.

La progesterona inhibe la secreción de PRL al final de la preñez. La administración del antiopioide NAL a ratas pretratadas con el antiprogesterona Mifepristone (Mp) en el día 19 de preñez, induce un aumento en los niveles séricos de la PRL. Previamente demostramos que el tratamiento con Mp disminuye el tono dopaminérgico a nivel central facilitando la acción estimuladora de NAL.OBJETIVO: Establecer a nivel hipofisario, el mecanismo responsable del incremento sérico de PRL por inmunomicroscopía electrónica (IME) y por análisis de la expresión de RNAm PRL.MATERIALES Y METODOS: En el día 19 de preñez, se administró Mp (5 mg/kg, sc) ó aceite las 8.00 h día y NAL (2 mg/kg,ip) ó salina (SAL) a las 17.30 h. Por decapitación (18.00 h), se obtuvo sangre para determinar PRL sérica (RIA), y la adenohipófisis para IME y extraer el ARN total (TRIzol) para

establecer la expresión de PRL por RT-PCR semicuantitativa. RESULTADOS: NAL no modificó la expresión de PRL ni el predominio de lactotropas atípicas y quiescentes propias de la inhibición. Mp indujo un aumento significativo en la expresión de PRL (V+SAL: 1.9 ± 0.3 ; Mp+SAL: 4.5 ± 0.4 ; $p < 0.01$) y la IME mostró activación celular por el predominio de formas activas con gránulos inmaduros en formación. En presencia de Mp, NAL disminuyó la expresión del mensajero (Mp+NAL: 2.9 ± 0.3 vs Mp+SAL; $p < 0.05$); sin embargo fue significativa la acumulación de proteína liberada al espacio extracelular con persistencia de lactotropas típicas y activas, aunque algunas células comenzaron a mostrar signos de involución. CONCLUSIONES: 1) El bloqueo de la acción de progesterona activa el lactotrofo evidenciado por la presencia de células activas y un importante aumento en la expresión de mRNA PRL. 2) NAL estimula la liberación de PRL sólo en presencia de Mp. 3) El aumento de PRL inducido por la administración de NAL llevaría a una inhibición de la actividad del lactotrofo sugerida por la presencia de células en regresión y bajos niveles de expresión del mensajero.

799. (7073) EL HIPOTIROIDISMO PROLONGA LA GESTACIÓN A TRAVÉS DE UN RETRASO EN LA LUTEÓLISIS.

HAPON, MARIA BELEN; BONAFEDE, MELISA M.; JAHN, GRACIELA A.

LARLAC-IMBECU, CRICYT.

En la rata el cuerpo lúteo (CL) es la principal fuente de progesterona durante la preñez. Hacia el final de la misma, el CL expresa la enzima 20 alfa hidroxisteroide deshidrogenasa (20a HSD) que convierte la progesterona en un metabolito biológicamente inactivo, con lo que se induce la luteólisis y la caída de progesterona, fenómeno crucial para la inducción del parto. Recientemente encontramos que el hipotiroidismo retrasa el parto 1 a 2 días en las ratas. El objetivo de este estudio fue determinar si este efecto del hipotiroidismo (hipoT) esta mediado por cambios en la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de progesterona. El hipoT se indujo en ratas de la cepa Wistar por administración del antitiroideo propiltiouracilo (0,1 g/L) en el agua de bebida, a partir del 8vo día previo al inicio de la gestación. Las ratas fueron sacrificadas los días 19 y 21 de gestación y 2 de lactancia. Se utilizó RT-PCR para determinar la expresión relativa a L19 de dos enzimas involucradas en la síntesis, 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa, (3 β HSD) y catabolismo de progesterona, 20a HSD, en RNA total obtenido de los cuerpos lúteos. Las hormonas séricas (PRL, progesterona, estradiol) se determinaron por RIA. Encontramos valores elevados de progesterona el día 21 de preñez (Co: 8.6 ± 0.9 vs hipoT: 32.3 ± 6.1 ng/ml) y de PRL (Co: 23.4 ± 13.5 vs hipoT: 71.2 ± 11.3 ng/ml), mientras que el estradiol disminuyó (Co: 12.9 ± 3.6 vs hipoT: 1.8 ± 0.7 pg/ml). La 20a HSD disminuyó en G19 (Co: 0.84 ± 0.07 vs hipoT: 0.58 ± 0.08 , $p < 0.05$) y tuvo una tendencia a la disminución en G21 (Co: 1.91 ± 0.13 vs hipoT: 1.54 ± 0.13 , N.S.). La 3 β HSD, en cambio no sufrió cambios significativos entre los diferentes días ni entre controles e hipoT. El hipoT provoca un atraso en la inducción de 20a HSD, que provoca retraso en el aumento del catabolismo de progesterona, que sería, a su vez, responsable del atraso en la luteólisis, caída de progesterona sérica y atraso en el parto, sin modificar la expresión de la enzima relacionada a su síntesis.

800. (7078) ADELANTO DE LA SENESCENCIA REPRODUCTIVA EN LA RATA INDUCIDA POR HIPOXIA-ISQUEMIA NEONTAL. EZQUER, MARCELO; VIDELA, GUILLERMO; SELTZER, ALICIA; JAHN, GRACIELA

LARLAC-IMBECU, IHEM

Un episodio hipoxico (H) acompañado o no por isquemia (HI) es causa de lesiones cerebrales en el recién nacido, sin embargo es poco lo que se conoce acerca de su impacto en la etapa reproductiva posterior. En el presente trabajo evaluamos los efectos de la H o HI en diversos aspectos reproductivos de la rata

hembra. Ratas de 7 días de edad fueron sometidas a ligadura unilateral de carótida (I) seguido de H (O₂ 6.5% 40 min) o a H sola; se determinó el día de apertura vaginal, se ciclaron diariamente y se realizó por RIA el perfil hormonal (LH FSH PRL) a los 3 (ciclos regulares de 4 días) y 7 meses de edad. No hubieron diferencias en la curva de crecimiento, pubertad, fertilidad o eficiencia en la lactancia. El pico preovulatorio de LH disminuyó significativamente en HI (60%) e H (80%) a los 3 meses de edad. Las ratas HI e H comenzaron a presentar períodos de estro constante a los 5-6 meses de edad, 2-3 meses antes que los controles. En un intento por conocer los mecanismos involucrados en este proceso evaluamos por RT-PCR la expresión relativa a actina de factores de crecimiento, receptores de estrógeno alfa/beta (RE a/b), opioides μ (RO); iNos y nNos, 48h, 7días, 30 días y 18 meses post lesión en el hipotálamo mediobasal (MBH). Resultados: a las 48h encontramos una disminución con respecto al control en ER β , RO μ , iNos y nNos ($p < 0.05$); estos cambios fueron total o parcialmente antagonizados por la administración de alfa-tocoferol (scavenger de radicales libres); los valores se normalizaron a los 7 días pero a los 30 días de edad ER α , ER β y RO μ aumentaron respecto al control ($p < 0.05$). Los cambios en los receptores fueron confirmados por Western blot. La HI neonatal produce un adelanto en la senescencia reproductiva de la rata, asociado a una disminución temprana del pico preovulatorio de LH, consecuencia probable de la alteración de la expresión génica en el HMB especialmente de RE a/b y RO μ . Estos cambios podrían estar mediados al menos en parte por la producción de radicales libres en el episodio hipóxico.

801. (7130) EFECTO DE NOREPINEFRINA SOBRE EL METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO EN ÚTERO AISLADO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RESTRINGIDA. CAMPOS, MARÍA LILIANA; LINARES, JORGE; FINKELBERG, ANA; GOLDRAIJ, ADOLFO

Cátedra De Fisiología, Facultad De Odontología, Universidad Nacional De Córdoba

En una publicación anterior (Prost. Leukot. Essent. Fatty Acid:70,2004,17-22) se demostró que la restricción alimenticia trae aparejada una caída del metabolismo de la glucosa en útero aislado de rata. El presente trabajo tiene por objetivo evaluar la acción de norepinefrina sobre dicho metabolismo y su posible relación con el sistema de óxido nítrico y ciclooxigenasa. Una dieta restringida (50% de la comida habitual) durante 25 días (DR) provoca una disminución ($P < 0.01$) del metabolismo evaluado por la producción de (14) CO[2] a partir de U(14) -C-glucosa en relación a controles (C) normalmente alimentados. Los úteros de ratas DR presentan una mayor concentración de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) (método de Bredt y Snyder que mide la conversión de (14)C-arginina en (14)C-citrulina) que los C (46.97 ± 2.5 v. 28.33 ± 5.84). La incorporación de norepinefrina (3×10^{-6} M) al medio de KRB aumenta el consumo de glucosa en ratas DR ($P < 0.001$), efecto revertido por ácido acetil salicílico (10^{-4} M) ($P < 0.01$). Norepinefrina en dicha concentración no tiene efecto en C. En una nueva serie de experimentos NAME ($500 \mu\text{M}$) inhibidor no selectivo de NOS o aminoguanidina ($500 \mu\text{M}$) inhibidor selectivo de iNOS, revierten el efecto estimulante de la norepinefrina ($P < 0.01$ y $P < 0.001$) respectivamente, una situación semejante ocurre con NS398 ($30 \mu\text{M}$) inhibidor selectivo de COX-2 ($P < 0.001$). La dieta restringida disminuye significativamente ($P < 0.01$) la producción de PGE[2], PGF[2 α], y TXB[2] a partir de (14) C-ácido araquidónico y esta situación es revertida por norepinefrina ($P < 0.001$). Se puede concluir que en condiciones de baja alimentación la norepinefrina por intermedio de iNOS y COX-2 aumenta la producción de algunos eicosanoides conocidos como estimulantes del metabolismo de la glucosa.

802. (7174) CÉLULAS LH Y FSH DE LA PARS DISTALIS HIPOFISARIA DE VIZCACHA (LAGOSTOMUS MAXIMUS MAXIMUS). VARIACIONES ESTACIONALES Y EFECTO DE MELATONINA. FILIPPA, VERÓNICA; PENISSI, ALICIA(1); MOHAMED, FABIAN

Catedra de Histología y Embriología, Universidad Nacional de San Luis, San Luis- Argentina, Instituto de Histología y Embriología, UNCuyo, CONICET, Mendoza, Argentina

En la pars distalis hipofisaria (PD) de vizcacha, roedor de reproducción estacional, se localizaron las células LH y FSH. El objetivo del trabajo fue estudiar sus probables variaciones estacionales morfológicas y su participación en los mecanismos de control reproductivo. Distribución, forma y porcentaje de área de las gonadotropas se estudiaron mediante inmunohistoquímica y análisis de imagen en vizcachas machos adultos capturadas en los tres períodos del ciclo reproductivo anual y después de la administración crónica de melatonina. Las células LH y FSH fueron ovals o esféricas con núcleo excéntrico. Se ubicaron limitando vasos sanguíneos, formando cordones, cercanas a estructuras foliculares y ocasionalmente aisladas. En verano (período reproductivo), las células LH se hallaron ampliamente distribuidas en la PD ocupando el $4,51 \pm 0.23\%$ del área. En invierno (regresión gonadal), el área inmunopositiva disminuyó a $2.48 \pm 0.24\%$. En primavera (recuperación gonadal) el área fue $2.29 \pm 0.18\%$. En los dos últimos períodos las células se localizaron principalmente en la región ventro-medial. Las células FSH en verano e invierno se localizaron en la región ventro-medial y ocuparon $0.41 \pm 0.06\%$ y $1.09 \pm 0.04\%$ del área, respectivamente. El área inmunopositiva fue máxima en primavera, $5.39 \pm 0.25\%$, observándose células FSH distribuidas en toda la PD. Melatonina produjo variaciones en la distribución y disminución del área inmunopositiva de las células LH, por el contrario no se observaron cambios en las células FSH. Las células LH presentan mayor actividad en el período reproductivo y las células FSH en el período de recuperación gonadal, demostrándose su participación en la esteroidogénesis y espermatogénesis testicular, respectivamente. Las variaciones estacionales en la distribución sugieren que en la región ventro-medial se sintetizan ambas hormonas y en la periferia sólo una de ellas. Melatonina actúa diferencialmente sobre la síntesis de LH y FSH en este roedor.

803. (7326) ANÁLISIS DIGITAL DE IMÁGENES EN PLACENTAS PORCINAS. MERKIS, CECILIA; CRISTOFOLINI, ANDREA; FRANCHINO, MARÍA; ABATE CANO, LAURA; MOSCHETTI, ELSA; KONCURAT, MIRTA

Area de Microscopía Electrónica. Facultad de Agronomía y Veterinaria. U.N.R.C., Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina

La placenta es el órgano que soporta la gestación en la mayoría de los mamíferos. Los suinos son una especie política y la placenta porcina es epiteliocorial, difusa, plegada y no invasiva. En esta especie la preñez depende de las interdigitaciones que se conforman entre el epitelio trofoblástico fetal y el epitelio uterino materno en forma de vellosidades, las que permiten el traspaso de todos los nutrientes necesarios para el correcto crecimiento y desarrollo fetal. El objetivo del trabajo fue determinar Área Total y Área Epitelial de vellosidades placentarias porcinas provenientes de diferentes períodos gestacionales, mediante un analizador digital de imágenes. Se realizaron preparados histológicos de 5 placentas porcinas por cada período gestacional estudiado: ± 28 , 55 , 70 días de gestación y a término (± 114 días). Para la medición de los parámetros morfológicos se utilizó un equipo de análisis digital de imágenes. Se construyó una "macro" que consta de cinco secciones y permite automatizar las mediciones realizadas en los cortes histológicos placentarios porcinos provenientes de los diferentes períodos gestacionales. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: a los 55 días de gestación ($137,65 \pm 24,68 \mu$) ya se observaron valores medios similares de Área Total a los hallados en placentas a término ($139,15 \pm 59,03 \mu$). Se encontró una disminución significativa del Área Total de las vellosidades a los 70 días de preñez ($86,58 \pm 49,53 \mu$). Con respecto al Área Epitelial, se observaron altos valores desde los 28 días de preñez ($46,98 \pm 18,83 \mu$) con una disminución hacia el día 70 ($43,22 \pm 34,62 \mu$) y un aumento al final de la gestación ($55,20 \pm 18,18 \mu$). En conclusión observa-

mos desarrollo de vellosidades placentarias hasta los 55 días de preñez, disminución de Área Total y Área Epitelial hacia el día 70 que podría corresponderse con una disminución del crecimiento placentario acompañando al aumento del peso fetal y el Área Epitelial desarrollada desde los 28 días con un aumento en placentas a término.

804. (7404) RECEPTORES OPIOIDES INVOLUCRADOS EN LA SECRECIÓN DE PROLACTINA (PRL) INDUCIDA POR ESTRÉS EN LA PREÑEZ. ROL DE DOPAMINA (DA). SOAJE, MARTA; GAMBOA, DANTE; DEIS, RICARDO

IMBECU

Al final de la preñez, la progesterona (P4) mantiene el tono dopaminérgico que inhibe la secreción de PRL y previene la respuesta al estrés. Se demostró en el día 19 de preñez, que el tratamiento con el antiopioide naloxona (NAL) aumenta los niveles de PRL sérica en respuesta al estrés y los esteroides sexuales condicionan esta respuesta. OBJETIVOS: Establecer el rol de DA en la acción de NAL sobre la secreción de PRL inducida por estrés y determinar los subtipos de receptores opioides que participan. MATERIALES Y METODOS: Ratas en día 19 de preñez fueron tratadas con L-DOPA (100 mg/kg,ip, 45 min antes de la decapitación) y NAL (2 mg/kg,ip, 30 min antes de la decapitación). Ratas canuladas en el ventrículo lateral (día 12) fueron inyectadas icv (día 19) con los antagonistas opioides Funtalrexamina (FNA, 5 μ g/rata, 4 h antes de la decapitación), Nor-Binaltorfimina (Nor-BNI, 10 μ g/rata, 30 min antes) y Naltrindole (NALT, 5 μ g/rata, 30 min antes). Los animales fueron sometidos a estrés con eter (2 min), 5 min antes del sacrificio (10.00 -12.00 h). Se utilizaron ratas controles sin estrés. La PRL sérica se determinó por RIA. RESULTADOS: L-DOPA previno la respuesta de NAL al estrés (SAL: 10.9 ± 4.5 ng/ml; NAL: 25.7 ± 4.2 ng/ml; L-DOPA+NAL: 3.9 ± 0.4 ng/ml). El estrés indujo un aumento en la secreción de PRL en el grupo tratado con vehículo (V: 2.6 ± 0.3 ng/ml; V+estrés: 17.6 ± 2.4); este efecto fue potenciado por la administración de FNA (antagonista μ : 52.6 ± 12.3 ng/ml). La administración de Nor-BNI (antagonista κ) ó NALT (antagonista δ) no modificó la respuesta al estrés comparada con el control. CONCLUSIONES: 1) El aumento de los niveles de DA inducido por L-DOPA, bloquea la respuesta de NAL al estrés. 2) La administración icv incrementa la respuesta al estrés ya que el grupo tratado con V aumenta la secreción de PRL a pesar de los niveles elevados de P4. 3) El receptor μ -opioide participa en la respuesta estimuladora de NAL sobre la liberación de PRL en respuesta al estrés y los receptores κ y δ no participan.

805. (7769) EL HIPERTIROIDISMO PRODUCE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES EN LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATA EN EL DÍA 21 DE LACTANCIA. CECI, LAURA; JAHN (1), GRACIELA; VARAS, SILVIA

Universidad Nacional de San Luis, Laboratorio de Química Biológica. UNSL. San Luis. (1) LARLAC-IMBECU (CRICYT), CONICET, Mendoza

El hipertiroidismo (HT) inducido por T4 (10 μ g/100 peso corporal sc) produce una disminución en la síntesis de triglicéridos (medidos por incorporación de 3H_2O), un aumento en las células TUNEL (+) y en la expresión de IGF I y clusterina en glándula mamaria (GM) de ratas en el día 21 de lactancia, L21 (Varas y col. *Reproduction* 2002 12:691). El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el efecto del HT sobre la expresión y regulación de distintos receptores hormonales, enzimas responsables de la síntesis y degradación de lípidos y marcadores de adipogénesis e involución. Se midieron las concentraciones relativas de mRNA por RT-PCR semicuantitativa de los siguientes genes: FAS, ACC, LPL, aP2, SREBP 1c, ACO, GPAT, HMG-CoA Reductasa, PPAR γ , ADRP (adipocyte differentiation related protein), P53, AIF (apoptosis inducing factor), receptores α y β de estrógenos y largo de prolactina (RPrIL). Los valores fueron normalizados en relación al gen control β

actina. Los valores son expresados como la media \pm SEM, con n=6. Se consideraron diferencias significativas para un p<0.05. El HT produjo una disminución de la expresión de ACC (HT: 0.85 \pm 0.06, Co: 1.2 \pm 0.11), SREBP1c (HT: 1.01 \pm 0.04, Co: 1.3 \pm 0.07), GPAT (HT: 0.10 \pm 0.04, Co: 0.3 \pm 0.07), PPAR γ (HT: 0.56 \pm 0.03, Co: 0.65 \pm 0.01), P53 (HT: 0.31 \pm 0.2, Co: 1.02 \pm 0.5); y un aumento de AIF (HT: 0.83 \pm 0.07, Co: 0.44 \pm 0.1) y RPrL (HT: 0.89 \pm 0.1, Co: 0.56 \pm 0.2). No se observaron diferencias significativas en la expresión génica de los restantes parámetros analizados. El HT produce una disminución de la secreción láctea que esta relacionada con la menor síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y con el establecimiento precoz de involución mamaria; el proceso de muerte celular instalado sería p53 independiente. La inducción del AIF podría sugerir un rol de este factor en el proceso de involución de la GM. A pesar de ello, la continua succión de las crías también estimularía señales anti-apoptóticas (IGFI, RPrL) para intentar mantener la funcionalidad del epitelio glandular.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 3: EN PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y APOPTOSIS

806. (6865) MODULACIÓN POR FSH DE SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN ESTIMULADAS POR BFGF E IL1 β EN CÉLULAS DE SERTOLI (CS) RIERA, MARÍA FERNANDA; GALARDO, MARÍA NOEL LUJÁN; PELLIZZARI, ELIANA H; MERONI, SILVINA; CIGORRAGA, SELVA B

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE)

La CS de 20 días de edad se encuentra en una etapa de diferenciación terminal y no posee actividad mitogénica. FSH, hormona relacionada con la proliferación y la diferenciación de CS, actúa fundamentalmente por vías AMPc/PKA y PI3K/PKB. Otros factores de importante acción moduladora en CS son el bFGF e IL1 β . bFGF e IL1 β estimulan en otros tipos celulares señales tales como MAPK y P70S6K relacionadas con procesos mitóticos. El objetivo del trabajo fue analizar si bFGF e IL1 β activan MAPK y P70S6K en CS y si FSH puede regular la activación de estas vías. Se utilizaron cultivos de CS provenientes de ratas de 20 días que se estimularon con FSH (100ng/ml), IL1 β (50ng/ml) y bFGF (30ng/ml). Se analizaron por Western blot los niveles de MAPK y P70S6K fosforiladas (MAPK-P y P70S6K-P). Se observó que FSH inhibe los niveles de MAPK-P y P70S6K-P mientras que bFGF e IL1 β estimulan ambas señales. El tratamiento conjunto de bFGF o IL1 β con FSH resultó en una inhibición de MAPK-P y P70S6K-P estimuladas por el factor de crecimiento o la citoquina (MAPK-P, FSH: 0.5 \pm 0.2; bFGF: 7.3 \pm 1.9; IL1 β : 2.7 \pm 0.6; FSH+bFGF: 4.5 \pm 0.7, FSH+IL1 β : 1.6 \pm 0.9 y P70S6K-P, FSH: 0.45 \pm 0.2; bFGF: 5.3 \pm 1.1; IL1 β : 8.4 \pm 1.5; FSH+bFGF: 1.2 \pm 0.4, FSH+IL1 β : 4.7 \pm 1.1). Los resultados se expresan como veces de estímulo con respecto al basal de la relación entre los niveles de proteína fosforilada y total en cada tratamiento (X \pm DS, n=3). Los resultados obtenidos sugieren que FSH, en este momento de la maduración de la CS, inhibe aquellas señales que pueden estar relacionadas con la proliferación celular y que son estimuladas por factores de crecimiento y citoquinas, promoviendo de esta manera el proceso de diferenciación terminal de esta célula.

807. (7043) EFECTOS NO GENÓMICOS DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA) EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO. CARNEVALE, ROMINA; SCHILLACI, ROXANA; SALATINO, MARIANA; PROIETTI, CECILIA; RIVAS, MARTIN; ROSEMBLIT, CINTHIA; CHARREAU, EDUARDO; BAL DE KIER JOFFE, ELISA (1); ELIZALDE, PATRICIA V

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Instituto de Oncología Angel H. Roffo (1)

Recientemente se observó que los efectos biológicos de las hormonas esteroideas pueden ser mediados por receptores

transcripcionalmente inactivos. Trabajos previos realizados en el laboratorio demostraron que el MPA inhibe la actividad de proteasas involucradas en la invasión y metástasis, tales como el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), en células de un carcinoma mamario murino progestágeno dependiente. En el presente trabajo se estudió la capacidad del MPA de inhibir la actividad de uPA en células de carcinoma mamario murino LM3 en forma independiente de la actividad transcripcional del receptor de progesterona (RP), analizando además, las vías de transducción involucradas. Las células LM3, RP(-), fueron transfectadas transientemente con un plásmido de expresión conteniendo la isoforma B del RP, RP(+), o una forma transcripcionalmente inactiva (RPi) junto con un plásmido conteniendo elementos de respuesta a progesterona río arriba del gen de luciferasa. La actividad de esta enzima se utilizó como control de la actividad transcripcional del RP. El tratamiento con MPA 10nM por 24hs disminuyó la actividad de uPA, evaluada por zimografía de caseína y plasminógeno, en las LM3 tanto RP(+) (35 \pm 4%) como RPi (37 \pm 5%). La disminución de la actividad de uPA por MPA fue revertida por el tratamiento con el antiprogestágeno RU486 (10nM) en las LM3 transfectadas con ambos tipos de receptores. La presencia de los inhibidores específicos de las vías de las ERK1/2, U0126 (10 μ M), y de la PI-3K/AKT, LY294002 (2 μ M), revirtió la inhibición de la actividad de uPA por el progestágeno tanto en las LM3 RP(+) como en las RPi. Estos resultados demuestran por primera vez que la inhibición de la actividad de uPA por MPA en células de carcinoma mamario está mediada por el receptor clásico de progesterona, en forma independiente de su actividad transcripcional y a través de las vías de las ERK1/2 y de PI-3K/AKT.

808. (7060) PARTICIPACIÓN DE LAS QUINASAS JANUS 1 Y 2 (JAK1 Y JAK2) EN LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA TRANSDUCTORA DE SEÑALES Y ACTIVADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN 3 (STAT3) INDUCIDA POR PROGESTÁGENOS EN CÁNCER DE MAMA. PROIETTI, CECILIA; ROSEMBLIT, CINTHIA; SALATINO, MARIANA; SCHILLACI, ROXANA; CARNEVALE, ROMINA; CHARREAU, EDUARDO; ELIZALDE, PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Previamente demostramos que el acetato de medroxiprogesterona (MPA) promueve la activación transcripcional de Stat3 en células C4HD progestágeno-dependientes, provenientes de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA (Proc Am Assoc Cancer Res 45:105, 2004). El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de Jak1 y Jak2 en la activación de Stat3 por progestágenos en las células C4HD. Además investigamos la regulación de Stat3 por MPA en la línea celular de cáncer de mama humano T47D. Demostramos que la estimulación de las células C4HD con MPA (10nM) durante 5 y 10 minutos, indujo la fosforilación en tirosina de Jak1 y 2, medida por ensayos de Western blot utilizando anticuerpos contra las formas fosforiladas de estas quinasas. Este efecto fue bloqueado por el antiprogestágeno RU486 (10nM). La transfección transiente de las células C4HD con las formas inactivas Jak1 dominante negativo (Jak1DN) o Jak2DN (las cuales inhiben la fosforilación de las quinasas endógenas), resultó en la inhibición de la capacidad del MPA de inducir la fosforilación de Stat3. 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 la presencia de Jak1DN y Jak2DN bloqueó la capacidad del MPA de aumentar la actividad luciferasa. El MPA indujo también la fosforilación y activación transcripcional de Stat3 en las células T47D y este efecto fue bloqueado por el pretratamiento con RU y por la presencia de los Jak1DN y Jak2DN. Estos resultados demuestran que el MPA induce la fosforilación en tirosina y la activación transcripcional de Stat3 actuando a través del clásico receptor de progesterona en células de cáncer de mama humano y murino, mediante un mecanismo que requiere la activación de Jak1 y Jak2.

809. (7066) PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA TRANSDUCTORA DE SEÑALES Y ACTIVADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN 3 (STAT3) EN LA PROLIFERACIÓN DE CARCINOMAS MAMARIOS INDUCIDA POR PROGESTÁGENOS. PROIETTI, CECILIA; SCHILLACI, ROXANA; SALATINO, MARIANA; ROSEMBLIT, CINTHIA; SALATINO, MARIANA; CARNEVALE, ROMINA; BÉGUELIN, WENDY; CHARREAU, EDUARDO; ELIZALDE, PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Previamente demostramos que el acetato de medroxiprogesterona (MPA) promueve la activación transcripcional de Stat3 en células C4HD progestágeno-dependientes, provenientes de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA. En este trabajo, investigamos la relación entre la activación de Stat3 inducida por MPA y la proliferación celular. Para ello, transfectamos células C4HD con una forma dominante negativa de Stat3 (Stat3Y705-F), la cual inhibe la dimerización y la unión al ADN de Stat3 endógena o con un mutante constitutivamente activo de Stat3 (Stat3C), el cual activa espontáneamente la transcripción. La proliferación de las células transfectadas fue evaluada por tinción con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo. La expresión de Stat3Y705-F inhibió la proliferación inducida por MPA, resultando en una disminución del 56% de células en fase S y del 53,5% de células en fase G2/M en comparación con células no transfectadas. Por el contrario, la transfección con Stat3C, indujo crecimiento MPA-independiente. Estudiamos la participación de Stat3 en la expresión del gen antiapoptótico Bcl-x[L], la cual está regulada por MPA. Stat3Y705-F inhibió el aumento de la expresión de dicho gen en presencia de MPA. En cambio, Stat3C indujo un aumento en los niveles de Bcl-x[L] comparables a los inducidos por progestágenos. Estos hallazgos proporcionan las primeras evidencias experimentales de que i) Stat3 participa en el crecimiento de células de cáncer de mama inducido por progestágenos y ii) existe una asociación directa entre la proliferación hormono-independiente del cáncer mamario y la activación de Stat3.

810. (7159) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN BCL-X POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF) EN CÉLULAS MAMARIAS DE RATÓN. ROMORINI, LEONARDO (1); TANOS, TAMARA B. (2); COSO, OMAR A. (2); PECCI, ADALI (1,2)

Dptos de: (1) Química Biológica y (2) Fisiología, Biología Molecular y Celular FCEN-UBA

La señalización dependiente de EGF ha sido asociada al control de la proliferación y la apoptosis en diversos tipos celulares. El gen bcl-X codifica para varias isoformas con funciones opuestas en el control de la muerte celular, i.e.: Bcl-XL (antiapoptótica) y Bcl-XC (proapoptótica). El perfil de expresión de esas isoformas depende de la actividad de 5 promotores y varía en las diferentes etapas de desarrollo de la glándula mamaria. La línea celular HC11 derivada de epitelio mamario de ratón, fue empleada para estudiar el control de la expresión de bcl-X en respuesta a EGF. Transfecciones transientes en HC11 con vectores de expresión (pP1-pP5) que contienen fragmentos de cada promotor fusionados al gen reportero luciferasa, mostraron que en presencia de EGF se induce significativamente la actividad del promotor P4 (1.64±0.17 veces vs Control), no observándose este efecto en la actividad de los demás promotores. Resultados de nuestro laboratorio mostraron que la activación de P4 correlaciona con un aumento en los niveles de Bcl-XL en este tipo celular. El análisis de la secuencia río arriba de P4 mostró la presencia de un posible sitio de unión al factor AP-1 a una distancia de -290 nt respecto del inicio de la transcripción. La activación de P4 por EGF no se observó en células transfectadas con un vector reportero que contiene el fragmento de P4 con el sitio AP-1 delecionado (0.96±0.04 veces vs Control). Con el fin de dilucidar qué caminos de señalización median esta acción de EGF se llevaron a cabo transfecciones transientes con

el vector pP4 y las células transfectadas se incubaron con EGF en presencia o ausencia de distintos inhibidores de proteínas quinasas blanco de la acción de este factor. Los resultados mostraron que el inhibidor de ERK 1/2, PD98059, bloquea la activación de P4 mediada por EGF. En conclusión EGF induciría la expresión de bcl-X regulando un sitio AP-1 ubicado río arriba de P4 siendo ERK1/2 posibles mediadores de esa respuesta.

811. (7221) EL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA) REGULA LA EXPRESIÓN DE CAVEOLINA-1 POR UN MECANISMO QUE REQUIERE ACTIVACIÓN DE MAPK Y PI-3K EN EL TUMOR MAMARIO MURINO C4HD. BÉGUELIN, WENDY; SALATINO, MARIANA; CECILIA, PROIETTI; CHARREAU, EDUARDO; ELIZALDE, PATRICIA V

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Caveolina-1 es la proteína mayoritaria de las caveolas, pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática, y su función está asociada con numerosos procesos celulares incluyendo la transducción de señales. Previamente identificamos, por Hibridación Substractiva, a caveolina-1 como un gen regulado positivamente por el tratamiento in vivo con MPA en el tumor mamario murino progestágeno dependiente C4HD. Ensayos de Northern y Western Blot confirmaron la expresión aumentada de caveolina-1 en tumores tratados con MPA y en la variante hormono-independiente C4HI, con respecto a los tumores C4HD sin tratar. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la regulación de la expresión de caveolina-1 por MPA y las vías de señalización involucradas, en cultivos primarios del tumor C4HD. El tratamiento de células C4HD con MPA (10nM) por 48hs, incrementó la expresión de caveolina. Este efecto fue bloqueado por el pretratamiento con el antiprogéstágeno RU486 (10 nM), indicando que el clásico receptor de progesterona está involucrado en la inducción. El pretratamiento de las células C4HD con LY294002 (2µM), inhibidor de la vía de la PI-3K/Akt o con U0126 (5µM), inhibidor de la vía de las MAPK, bloqueó el incremento de la expresión de caveolina inducido por MPA. El tratamiento a tiempos cortos con MPA indujo la fosforilación de caveolina en tirosina, medida con un anticuerpo específico para la forma fosforilada. El bloqueo de la expresión de caveolina con oligodeoxinucleótidos antisentido al ARNm de caveolina (0.5-2µM) inhibió de manera dosis dependiente la proliferación inducida por MPA (p<0.01). Nuestros resultados demostraron por primera vez que la expresión y fosforilación de caveolina están reguladas por progestágenos y que su expresión resulta indispensable en la proliferación progestágeno-dependiente. Esta regulación positiva de la expresión de caveolina involucra a las vías de señalización de MAPK y PI-3K/Akt.

812. (7269) EL INHIBIDOR DE QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS, P21, REGULA LA UBIQUITINACIÓN DE PCNA. SORIA, GASTÓN; PRIVES, CAROL (1); PODHAJECER, OSVALDO; GOTTIFREDI, VANESA

Fundación Instituto Leloir, Universidad de Columbia (1)

El inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, p21, interfiere con las actividades replicativas y reparativas del factor de procesividad PCNA in vitro. Coincidentemente, p21 es capaz de reprimir la replicación de ADN dependiente de PCNA en modelos celulares. Por otro lado, aunque el efecto de p21 en la reparación de ADN dependiente de PCNA en modelos celulares es menos claro, recientemente se estableció un vínculo entre la degradación de p21 en células y la eficiente reparación dependiente de PCNA durante irradiación UV. Además se identificaron formas mono y poli-ubiquitinadas de PCNA que promueven la reparación de ADN por intercambio de polimerasas que sugieren nuevos mecanismos potencialmente regulables por p21. Nuestro trabajo muestra una inducción en la ubiquitinación de PCNA luego de irradiación UV y otros tratamientos de stress genotóxico, entre ellos algunos que ocasionan el atascamiento de la horquilla de replicación. Esta modificación de PCNA se

observa tanto en células proliferantes como arrestadas, lo cual sugiere una regulación de la ubiquitinación de PCNA por procesos de "checkpoint" o reparación. Por otro lado, estas formas de PCNA son retenidas en una fracción no extraíble con tritón, lo que sugiere una íntima interacción de la forma ubiquitinada de PCNA con el ADN y un posible papel en procesos de reparación. Además, todos los tratamientos que inducen la ubiquitinación causan una notable caída en los niveles proteicos de p21. Es más, la expresión de un mutante estable de p21 durante la irradiación UV reduce los niveles de ubiquitinación de p21 lo cual demuestra la participación de p21 en la modulación de la ubiquitinación de PCNA. Dicha modulación no depende de la interacción entre ambas proteínas visto que un mutante estable de p21 que no interacciona con PCNA reduce eficientemente los niveles de ubiquitinación de PCNA. En conjunto, nuestros datos indican la posibilidad de un rol para p21 en la reparación dependiente de PCNA, mediante la inhibición de su ubiquitinación.

813. (7335) ORTOVANADATO SODICO INDUCE LA EXPRESION DE PROTEINAS RELACIONADAS CON EL LINAJE ERITROIDE: GATA-1 Y RECEPTOR DE ERITROPOYETINA (EPO-R). AGUIRRE, MARIA VICTORIA; JUARISTI, JULIAN; LUCAS, ANA; ALVAREZ, MIRTA; BRANDAN, NORA

Cátedra De Bioquímica.Facultad De Medicina.Universidad Nacional Del Nordeste.Corrientes.Argentina.

El vanadio posee diversos efectos biológicos dependiendo de su estado de oxidación, permaneciendo aún poco claro su efecto en la eritropoyesis. Hemos reportado un efecto estimulatorio sobre ésta a expensas de la amplificación y maduración de progenitores eritroides terminales en ratones tratados con ortovanadato sódico (Na[2]VO[4]). El % de captación de Fe(59) aumentó el doble respecto del control entre los 4º y 8º días (p<0.01) con aumento de eritroblastos policromatófilos (días 2 a 8) y ortocromáticos (día 8) en médula ósea (MO). El objetivo del presente trabajo fue correlacionar estos hallazgos con la expresión de proteínas específicas de linaje (factor transcripcional GATA-1 y EPO-R) y del factor antiapoptótico Bcl-x[L]. Una dosis de Na[2]VO[4] (33 mg/kg) fue administrada i.p. a ratones CF-1 (26 g, n=6). Suspensiones celulares de MO femoral se trataron con buffer RIPA a cada día del protocolo (0 a 8 días). Se fraccionaron 40 µg de proteínas en SDS-PAGE 12% con posterior electrotransferencia. Las expresiones de GATA-1, EPO-R y Bcl-x[L] fueron determinadas por inmunoblotting. La expresión de EPO-R aumentó desde el tercer día hasta el final del estudio (p<0.01) similar a GATA-1, con sobreexpresión a partir del 3º (p<0.05) y hasta el 8º día post-tratamiento (p<0.01). Sin embargo Bcl-x[L] evidenció una expresión constitutiva sin alteraciones durante toda la experiencia. Estos resultados sugerirían la existencia de una relación causal entre la expresión de las proteínas específicas de la línea eritroide GATA-1 y EPO-R y la amplificación de precursores eritroides terminales en MO con aumento de captación de Fe(59) en eritrocitos periféricos. Además, la ausencia de variaciones significativas en la expresión de Bcl-x[L] indicaría que el efecto estimulatorio sobre la proliferación y maduración eritropoyética ocasionado por la administración de Na[2]VO[4] predomina sobre el efecto antiapoptótico en los precursores eritroides terminales.

814. (7944) PARTICIPACIÓN DE PKC EPSILON, ERK1/2 Y PIT-1 SOBRE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA Y BIOSINTÉTICA DE CÉLULAS LACTOTROPAS IN VITRO INDUCIDA POR EGF. DE PAUL, ANA; GUTIÉRREZ, SILVINA; PETITI, JUAN PABLO; MUKDSI, JORGE; AOKI, AGUSTÍN; TORRES, ALICIA

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

Introducción: El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) es sintetizado y secretado por células hipofisarias normales y

tumorales estimulando la proliferación celular. Ejerce su acción a través de receptores con actividad tirosina-quinasa. Objetivo: determinar la posible participación de las enzimas PKC-epsilon y ERK1/2 y del factor de transcripción pituitario-específico (Pit-1) en el proceso proliferativo de células lactotropas por acción del EGF. Materiales y Métodos: Cultivos primarios adenohipofisarios de ratas hembras adultas fueron tratados durante 24h con EGF en diferentes dosis (25, 50, 100ng/ml). Se evaluó la proliferación de lactotropas por doble detección inmunocitoquímica de BrdU y prolactina (PRL). Se cuantificaron por western blot la expresión de: EGF-R, PKC-epsilon, ERK1/2-fosforilada, Pit-1 y PRL. El análisis estadístico se realizó por el test ANOVA-Tukey (p<0.05). Resultados: La exposición de las células hipofisarias a EGF durante 24h provocó un incremento significativo del EGF-R de una manera dependiente de la dosis. La expresión de las enzimas PKC epsilon, ERK 1/2 fosforilada y de la proteína Pit-1 incrementaron significativamente sus niveles respecto a los valores controles aunque no se observaron diferencias significativas entre las diferentes dosis de EGF. Un comportamiento similar se obtuvo al cuantificar los niveles de PRL donde se observó un incremento de la hormona acumulada semejante en los tres tratamientos en relación al control. Todas las dosis de EGF utilizadas aumentaron aproximadamente 7 veces la actividad mitótica de las lactotropas respecto al control (p<0.001). Los datos demuestran que las enzimas PKC epsilon y ERK1/2 formarían parte de la cascada de señales que median la proliferación de células lactotropas inducida por EGF, estimulando además la expresión de PRL. El incremento de la proteína Pit-1 sería indicativo de la participación de este factor de transcripción en estos procesos.

815. (7973) TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR LA ISOFORMA ATÍPICA DE PROTEÍNA QUINASA C (PKC ZETA) EXPRESADA EN UNA LÍNEA DE LINFOMA T MURINO. BARREIRO ARCOS, MARIA LAURA (1,2); SILBERMAN, DAFNE MAGALI (1); GORELIK, GABRIELA (1); KLECHA, ALICIA (2); GENARO, ANA MARIA (1,2); CREMASCHI, GRACIELA (1,2)

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, (2) Lab Radiosotopos FFyB, UBA

La isoforma atípica PKC zeta ha sido ampliamente involucrada en la regulación de varias funciones celulares que abarcan tanto fenómenos de proliferación como de muerte celular. Previamente demostramos una incrementada expresión de esta isoforma en linfocitos T tumorales BW5147 relacionada con su alta tasa proliferativa y con una elevada actividad de óxido nítrico sintasa (NOS). También comprobamos una disminución de la expresión genómica y proteica de la isoforma inducible de la NOS (iNOS) en células BW arrestadas. El objetivo de este trabajo fue profundizar los mecanismos intracelulares implicados en estos efectos. Para ello analizamos la acción de distintos bloqueantes de los caminos enzimáticos en los que participa la PKC zeta sobre la actividad proliferativa (evaluada por incorporación de timidina tritiada) y la actividad de NOS (medida por formación de [14C]-citrulina). Ambas actividades fueron inhibidas por la wortmanina, inhibidor de PI-3 quinasa y por la sulfasalazina, inhibidor de la IκB quinasa (p<0.05, n=4). Por ensayos de EMSA se evaluó la traslocación nuclear del NF-κB (NF-κB), en extractos nucleares de células BW tratadas en ausencia o presencia de staurosporina, inhibidor de PKC, comprobándose que el mismo disminuyó la activación de NF-κB. Tanto la staurosporina como la introducción intracelular de un Ac anti-PKC zeta inhibieron la proliferación celular (% de inhib/Stau: 81.3±7.9%, de inhib/Ac: 50±4.9) y la expresión genómica y proteica de iNOS evaluados por ensayos de RT-PCR y western blot respectivamente. Estos resultados indicarían que la PKC zeta en las células de linfoma T BW, está relacionada con un aumento de la actividad y expresión de la iNOS, probablemente a través de la activación de NF-κB, y que este mecanismo estaría implicado en la regulación de la actividad proliferativa celular.

BIOLOGÍA CELULAR 5

- 816. (6752) REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA EN LA CÉLULA DE SERTOLI POR FSH, bFGF E IL1 β .** GALARDO, MARÍA NOEL LUJÁN; RIERA, MARÍA FERNANDA; PELLIZZARI, ELIANA H; MERONI, SILVINA; CIGORRAGA, SELVA B

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE)

FSH, bFGF e IL1 β incrementan la entrada de glucosa a la célula de Sertoli (CS) en estímulos agudos y crónicos. El inhibidor de síntesis proteica cicloheximida no bloquea dicha respuesta en estímulos agudos, sugiriendo que no está mediada por un incremento en la biosíntesis de los transportadores (GLUTs). El objetivo del trabajo fue analizar si existe aumento de GLUTs en la membrana plasmática con estímulos agudos de FSH, bFGF o IL1 β . Asimismo, analizar si estímulos crónicos aumentan la expresión de GLUT1, el más estudiado en CS. Cultivos de CS se estimularon con FSH (100ng/ml), bFGF (30ng/ml) e IL1 β (50ng/ml) por 1 hora (agudo) y se analizó la incorporación de (³H)-2-deoxiglucosa en presencia de distintas concentraciones de 2-deoxiglucosa. En idénticos tratamientos por 12, 24 ó 48 horas (crónico) se analizaron los niveles de ARNm y proteína GLUT1 por Northern y Western blot respectivamente. En estímulos agudos, por gráfico de Eadie Hofstee, se observó un incremento en la V_{máx} (nmoles/min) que refleja incremento de GLUTs en la membrana (B: 0.16 (r=0.9964); FSH: 0.23 (r=0.9834); bFGF: 0.28 (r=0.9823); IL1 β : 0.21 (r=0.9568)). En estímulos crónicos se observó aumento en los niveles de ARNm de GLUT1 (FSH 12hs: 4.0 \pm 0.8; bFGF 24hs: 3.2 \pm 0.7; IL1 β 12hs: 2.5 \pm 0.2, veces de estímulo con respecto al basal, X \pm DS, n=3) pero no modificaciones en la traducción. Los resultados obtenidos sugieren que los efectos rápidos observados en el incremento de la incorporación de glucosa en CS se deben a la translocación a la membrana plasmática de los GLUTs. La falla en demostrar un aumento en los niveles de GLUT1 acompañada de un aumento en la incorporación de glucosa en estímulos prolongados sugiere la participación de otro GLUT distinto del GLUT1.

- 817. (7313) EL INCREMENTO DE LA EXPRESIÓN DEL EGFR SE ASOCIA CON LA TRANSDIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS BRONQUIOLARES DE CLARA EN UN MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL.** ROTH, FELIX; AOKI, AGUSTIN; TORRES, ALICIA; MALDONADO, CRISTINA

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

El EGFR está involucrado en la diferenciación de células epiteliales en pulmón. En estudios previos en un modelo de asma, describimos que la célula de Clara, secretora de la proteína antiinflamatoria CC16, exhibió marcados cambios en su morfología, adoptando el perfil de células caliciformes. Objetivo: Establecer si los niveles de expresión del EGFR se relacionan con los cambios funcionales observados en la célula de Clara como respuesta a un estímulo inflamatorio. Materiales y métodos: Ratones hembra sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) por vía i.p. y posterior exposición inhalatoria al alérgeno ó a solución salina. Se determinó la expresión del EGFR, CC16 y MUC5AC por western blot e inmunocitoquímica (ICQ) ultraestructural. Los cambios morfológicos de las células de Clara se evaluaron por microscopía electrónica. El número de células CC16 positivas se estudió por morfometría. Los datos se analizaron por ANOVA-Tukey (p<0.05). Resultados: La expresión de EGFR incrementó significativamente en los animales alérgicos respecto al control. Los animales expuestos a OVA presentaron un aumento en los niveles de CC16. La morfometría demostró un mayor número de células CC16 positivas, sin modificarse el número total de células por bronquiolo. El análisis morfológico e ICQ revelaron la presencia de células de Clara inmunoreactivas para MUC5AC, escasas mitocondrias y numerosos gránulos electrolúcidos de gran tamaño, positivos para CC16. La célula de Clara en animales control presentó su clásico aspecto de cúpula con numerosas mitocondrias y algunos gránulos

electrodensos en la zona apical que inmunomarcaron para CC16, y fueron negativos para MUC5AC. La sobreexpresión del EGFR estaría relacionada con los cambios morfofuncionales de las células de Clara ante la exposición a un alérgeno. La colocalización de MUC5AC y CC16 en células de Clara indica un probable mecanismo de transdiferenciación celular hacia un perfil de célula caliciforme

- 818. (7331) SINTESIS Y TRANSPORTE EXOCITICO DEL GLICOLIPIDO GD3 EN CELULAS EPITELIALES CHO-K1.** IGLESIAS-BARTOLOME, RAMIRO; CRESPO, PILAR M.; DANIOTTI, JOSE LUIS

CIQUIBIC (UNC-CONICET), Fac. de Cs. Químicas, UNC, Córdoba, Argentina.

Los gangliósidos, glicolípidos que poseen ácido siálico, son sintetizados en el lumen del complejo de Golgi y serían incapaces de translocar hacia la superficie citosólica de las membranas para acceder a un transporte monomérico. Como consecuencia, los gangliósidos abandonarían el complejo de Golgi como componentes de la superficie luminal de vesículas de transporte. En este trabajo examinamos el transporte exocítico del disialogangliósido GD3 desde la red del trans-Golgi (TGN) hacia la membrana plasmática en células CHO-K1, previamente depletadas de gangliósidos mediante el uso de un inhibidor de la síntesis de glicolípidos. La síntesis de novo y el transporte de GD3, fue analizado mediante inmunodetección, marcación metabólica, tratamiento con Brefeldina A y expresión del dominante negativo de la GTPasa Rab11. Encontramos que el gangliósido GD3, a diferencia de una proteína luminal anclada mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) y de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSVG), es transportado desde TGN hacia membrana plasmática por una vía exocítica insensible a Brefeldina A. Además, la expresión de la forma dominante negativa de Rab11, la cual impide la salida de VSVG desde el complejo de Golgi, no influyó en la capacidad de GD3 para arribar a la superficie celular. Nuestros resultados indican que en células epiteliales CHO-K1 el gangliósido GD3 es transportado desde TGN hacia membrana plasmática por una vía vesicular no convencional. Además, los mismos sugieren que debería ocurrir una segregación lateral en membrana de VSVG y proteínas ancladas vía GPI del gangliósido GD3 antes de la salida de estas moléculas del TGN.

- 819. (7535) DETERMINANTES MOLECULARES DE LA CONCENTRACIÓN DIFERENCIAL DE LAS GLICOLÍPIDO GLICOSILTRANSFERASAS EN SUBCOMPARTIMENTOS DEL COMPLEJO DE GOLGI.** ULIANA, ANDREA; GIRAUDO, CLAUDIO; MACCIONI, HUGO

CIQUIBIC (UNC-CONICET)-Dpto de Química Biológica, Fac. de Ciencias Químicas, U.N.C. Córdoba, Argentina y CIQUIBIC(UNC-CONICET) Dpto de Química Biológica, Fac. de Ciencias Químicas,U.N.C. Córdoba, Argentina.

El aparato de Golgi juega un papel central en la glicosilación de proteínas y lípidos. Esta función es desempeñada por glicosiltransferasas que catalizan la adición secuencial de azúcares a proteínas y lípidos en tránsito a través de la vía secretora. Estas enzimas se localizan a lo largo de los subcompartimentos de Golgi siguiendo el orden en el que ocurre la glicosilación. Al igual que otras glicosiltransferasas, las glicosiltransferasas de glicolípidos (GGT) son proteínas de membrana tipo II con un dominio C-terminal orientado hacia el lumen de las cisternas del Golgi y un dominio N-terminal (Ntd) constituido por una cola citoplásmica corta (CT) y una región transmembrana (TMR). El fraccionamiento de Golgi in vivo con Brefeldina A (BFA) mostró que Sial-T2 se localiza en el Golgi proximal, mientras GalNAc-T se localiza en TGN. Aunque sabemos que los Ntds de las GGTs tienen información para su concentración en Golgi, no sabemos si contienen información para su concentración selectiva en los sub-compartimentos de Golgi, y de ser así, en que región de estos Ntds están localizados los determinantes. Para realizar este estudio, los Ntds de GGTs fusionados a la proteína fluorescente verde (GFP) se expresaron

en células CHO-K1, y su comportamiento frente al tratamiento con BFA fue comparado con el de marcadores endógenos de Golgi proximal y distal. De la misma manera se examinó el comportamiento de quimeras en las que se intercambiaron los CTs y TMRs de GalNAC-T y Sial-T2 fusionados a variantes espectrales de GFP (YFP y CFP). Para esto, la quimera fue co-transfectada, a células CHO-K1 con los Ntds enteros de GalNAC-t y Sial-T2, y su redistribución hacia el ER con la adición de BFA fue simultáneamente examinada por microscopía de fluorescencia. Se concluyó que los Ntds contienen determinantes para retener proteínas reporteras en el sub-compartimento de Golgi donde se concentra la proteína entera, y que al menos algunos de esos determinantes residen en el CT de estos Ntds.

820a. (7619) ROTURAS DE DOBLE CADENA INDUCIDAS POR FLUDARABINA SON REPARADAS POR REUNIÓN DE EXTREMOS NO-HOMÓLOGOS EN CÉLULAS HUMANAS. GONZALEZ CID, MARCELA; DE CAMPOS NEBEL, MARCELO; LARRIPA, IRENE

Depto de Genética, IHema, Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires, Argentina.

Fludarabina (FLU), análogo de adenosina, interfiere con la síntesis de ADN e inhibe la elongación de la cadena produciendo arresto de la replicación y roturas de doble cadena (RDC). Las células de mamíferos usan dos vías para reparar RDC: recombinación homóloga (RH) y unión de extremos no-homólogos (NHEJ). Nuestro objetivo fue evaluar la vía empleada en reparar las RDC inducidas por FLU en linfocitos y fibroblastos humanos normales. Las células se trataron con FLU 0,1-10µg/ml. Para evaluar el índice de replicación mitótica se agregó bromodeoxiuridina 10µg/ml, observándose arresto en primera división mitótica indicando una disminución de este índice en relación con el aumento de las dosis de FLU. Para evaluar la participación de RH, se analizó la cinética de formación de focos nucleares de Rad51 por inmunohistoquímica y la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en metafases de segunda división mitótica. FLU no indujo focos de Rad51 ni ICH en comparación con los controles no tratados. Para establecer si NHEJ está involucrada en la reparación se adicionaron al cultivo dos inhibidores de esta vía, vanilina (VN 300µM) y wortmanina (WTM 8µM) 1 hora antes del tratamiento con FLU. Se analizó la presencia de aberraciones cromosómicas (AC) en metafases de primera división mitótica. Los fibroblastos pretratados con VN mostraron aumento ($p=0,0034$) de AC ($19,3\% \pm 2,3$) en relación con los cultivos tratados sólo con FLU ($10,0\% \pm 2,0$). Con WTM, hubo un incremento de 3,8 veces el valor de AC obtenido en los cultivos tratados con FLU ($p=0,0117$). Además, los pretratamientos produjeron una mayor sensibilidad a la muerte celular medida con azul tripan. La presencia de VN y WTM indujeron un aumento del porcentaje de muerte celular de $28,4\% \pm 0,7$ ($p=0,0101$) y de $33,15\% \pm 6,1$ ($p=0,0179$), respectivamente, con respecto al tratamiento con FLU ($18,5\% \pm 3,8$). Estos resultados sugieren que para mantener la integridad genómica, la vía NHEJ estaría involucrada en la reparación de las RDC inducidas por FLU.

820b. (7645) ARGINILACIÓN POSTRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS NIH 3T3. CARPIO, MARCOS; DECCA, BELÉN; HALLAK, MARTA.

CIQUIBIC - Dep. Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas - UNC

La arginilación postraducción consiste en la unión covalente de arginina a un aminoácido ácido en la posición terminal NH2 de proteínas y es catalizada por la enzima R-transferasa. Previamente, hemos identificado varias proteínas solubles de cerebro de rata sustratos de esta modificación, entre ellas calreticulina (CRT). Esta proteína es sintetizada con un péptido hidrofóbico en su extremo amino terminal, el cual actúa como señal para la translocación cotraducción de la proteína al RE. En el RE este péptido se cliva, presentando un ácido aspártico en la posición terminal NH2. La incorporación «in vitro» de arginina a CRT se efectúa sobre dicho aminoácido, conforme lo demuestran estudios

de inmunotinción con un anticuerpo específico. CRT es una proteína residente del RE, donde actúa como chaperona y almacenadora de calcio, por otra parte la R-transferasa es una enzima citosólica. Si bien el sustrato y la enzima han sido descritos estar en compartimentos diferentes, la arginilación de CRT se produciría también en células intactas, de acuerdo a los resultados que se muestran a continuación. En este trabajo estudiamos la arginilación de CRT en células en cultivo empleando un anticuerpo específico para la forma arginilada de CRT (anti-RCRT). Cuando se analizaron extractos totales de células NIH 3T3 mediante la técnica de Western Blot, encontramos que el anticuerpo anti-RCRT reconoce una sola banda proteica cuya movilidad electroforética coincide con la de CRT. Al estudiar la localización subcelular de CRT arginilada mediante inmunocitoquímica encontramos que la misma se encuentra asociada a estructuras vesiculares, que no localizan con marcadores de RE. Nuestros estudios indican que: 1) la arginilación de CRT no sólo se efectúa en las condiciones experimentales de los ensayos «in vitro», sino que también se lleva a cabo en células en cultivo, 2) la arginilación de CRT se efectúa sobre un pool de esta proteína que no se encuentra en el RE, pudiendo ser un pool citosólico originado a partir de la retro-translocación de CRT desde el RE.

821. (8055) LA MAQUINARIA TRANSCRIPCIONAL RESPONDE A LA ACTIVACIÓN DE LA SÍNTESIS DE FOSFOLÍPIDOS C-FOS DEPENDIENTE MEDIANTE LA REMODELACIÓN DE LA CROMATINA. PORTAL, MAXIMILIANO MOISÉS; RENNER, MARIANNE; FERRERO, GABRIEL OMAR; CAPUTTO, BEATRÍZ L.

CIQUIBIC - Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, U.N.C Córdoba, Argentina.

El proto-oncogen c-Fos, un reconocido miembro de la familia de factores de transcripción AP-1, además tiene la capacidad de activar la síntesis de fosfolípidos en eventos relacionados con diferenciación y proliferación (FASEB J., 15:556, 2001 y Mol Biol Cell, 15:1881, 2004) de una manera independiente de su actividad como factor de transcripción. La activación de este metabolismo tiene profundos efectos sobre la biología celular en fenómenos que van desde la generación de nueva membrana hasta regulación del splicing (JCS, 114:2501; 2001), entre otros. Nosotros describiremos en este trabajo como c-Fos tiene la capacidad de activar el ciclo nuclear del PIP2 vinculando dicho metabolismo con respuestas de la maquinaria transcripcional. Los cambios en la misma se encuentran asociados a eventos de remodelación de cromatina. Mediante microscopía confocal se pudo establecer que la localización nuclear de c-Fos es discreta y co-localiza con enzimas de síntesis de fosfolípidos tales como la PIP2K y PIP3K, factores de remodelación de cromatina como BRG (Bhrma related gene) componente del complejo SWI/SNF, tanto como con la histona H1. El PIP2 nuclear aumenta en núcleos tratados con c-Fos recombinante exógeno concomitantemente con la liberación de la histona H1 de los nucleosomas y sorprendentemente un incremento en el tamaño de los núcleos fue observado. Se postula que c-Fos, mediante una actividad independiente de su actividad como factor de transcripción AP-1, puede regular eventos transcripcionales mediante la remodelación de la cromatina inducida por la liberación de proteínas histonas, alterando de esta manera el status de la maquinaria transcripcional sobre sets diferentes de genes a lo largo del genoma, regulando de esta manera cambios transcripcionales globales sin que exista una interacción directa entre c-Fos y la maquinaria transcripcional basal.

822. (8063) FRECUENCIA DE LOS ALELOS HLA CLASE II (DR Y DQ) EN PACIENTES CON LEPROA LEPROMATOSA. HABEGGER, ALICIA MARIA; MOTTA, PATRICIA; LODEIRO, NORMA (2); CECH, NORMA (2); FONTAN, CLAUDIA (2); SOTELO, MARÍA GRACIELA (2)

Histocompatibilidad. Hosp. J. C. Perrando, Microbiología y Servicio de Piel. Hosp. 4 de junio.

Dos tipos de glicoproteínas codificadas en el Complejo mayor de histocompatibilidad cumplen la función de presentar antígenos a los linfocitos T, son las moléculas de histocompatibilidad de clase I (HLA I) y clase II (HLA II), con diferentes espectros de especificidad de unión. El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de los diferentes alelos de HLA clase II en pacientes con Lepra lepromatosa (LL), con el fin de investigar si la presencia de ciertos alelos podrían conferir susceptibilidad o protección. En el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética J. C. Perrando se analizaron 33 muestras de pacientes con LL, derivados del Servicio de Piel del hospital 4 de Junio. Se tipificaron 112 controles sanos. Las muestras fueron tipificadas por biología molecular, con la técnica de hibridación inversa con oligonucleótidos secuencia específica (INNO-LiPA) y analizados con LiPA software. Se encontró una mayor frecuencia de los alelos HLA-DRB1*08 OR= 4, P=0.004 y HLA-DRB1*15 OR= 2.98, P=0.02, con significancia estadística. Se observó una disminución de la frecuencia de los alelos HLA-DRB1*07 OR= 0.89 P=0.07 y HLA-DRB1*13 OR= 0.17 P=0.12, sin significancia estadística. Con respecto al HLA-DQB1* se observó una disminución de la frecuencia del alelo HLA-DQB1*0201/0202 OR= 0.27, P= 0.03 y un aumento de los alelos HLA-DQB1*0305 OR= 14.58, P=0.01 con significancia estadística y HLA-DQB1*0501 OR= 1.24, P=0.8. sin significancia estadística. Nuestros datos indican que ciertos alelos HLA clase II podrían estar asociados con susceptibilidad y/o protección en el desarrollo de la lepra lepromatosa.

823. (8072) EFECTO QUIMIOATRACTANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LENTINUS LINDQUISTII EN EL TRACTO RESPIRATORIO DE RATÓN. BAGDADI, A; FERNANDEZ ALANIS, E; MARTIN, S; MANDALUNIS, P; ALBERTÓ, E; TASAT, D.

ECyT-UNSAM, FO-UBA, INTECH-IIB UNSAM

El incremento de trastornos inmunológicos del tracto respiratorio asociado a la contaminación ambiental hace necesario el desarrollo de medidas preventivas para disminuir la incidencia y severidad de este tipo de enfermedades. Existen diversos polisacáridos de la pared celular del género *Lentinus* con actividad inmunomoduladora. En este estudio evaluamos en ratones Balb C el potencial preventivo in vivo de un extracto etanólico de *Lentinus lindquistii* (LLF1), una variedad autóctona del norte argentino, sobre la respuesta inflamatoria inducida por ROFA (Residual Oil Fly Ash). Los animales recibieron vía intranasal 6 dosis de LLF1 (0.085, 0.170 y 0.340 mg/kg) durante dos semanas seguido por 3 dosis diarias (0.170 mg/kg) de ROFA, tres veces durante una semana. La respuesta inflamatoria pulmonar se evaluó mediante a) observación histológica del número de células calciformes (NCC) y b) recuento celular total (RCT) y diferencial (macrófagos y polimorfonucleares (PMN) en lavados broncoalveolares (BAL). Animales tratados solo con LLF1 no mostraron diferencias en el NCC pero si un leve aumento en el RCT para 0.085 y 0.170 (10 ± 1.3 y 15 ± 3.7 10(5), $X \pm ES$ respectivamente, $P < 0.05$) respecto de animales controles (6.9 ± 0.6 10(5)). La exposición a ROFA vs control mostró un aumento esperado en el NCC y en el RCT (20 ± 4.5 10(5), $P < 0.01$). Los animales que recibieron tratamiento conjunto (LLF1+ROFA) no mostraron diferencias significativas respecto de ROFA. El porcentaje de PMN para ROFA (43 ± 11 %) y LLF1+ROFA (44 ± 3.7 %) vs control (2.7 ± 0.5 %) fue significativamente ($P < 0.001$) mayor. Concluimos que LLF1 es quimioattractante pero carece de actividad antiinflamatoria.

824. (8102) GENERACIÓN DE UN DISPOSITIVO VESICAL MEDIANTE INGENIERÍA DE TEJIDOS. CORREA, LAURA; ROLDAN FERNANDO; PRIEGUE CAROLINA; RAFFO GUILLERMO

Laboratorio Craveri SAIC

La pérdida de la funcionalidad vesical puede causar incontinencia urinaria, infecciones, reflujo uretero-vesical y falla renal. Seguros de estómago e intestino son comúnmente usados para el reemplazo o reparación vesical, pero han sido asociados con múltiples complicaciones como infecciones, desórdenes metabólicos,

producción excesiva de moco, neoplasia, cálculos y perforación. Estas complicaciones son el resultado de las diferencias entre los epitelios vesicales y gastrointestinales. El epitelio que recubre la vejiga, uréter y uretra provee una barrera selectiva entre la orina y el tejido conectivo subyacente y está compuesto de muchas capas celulares. La Ingeniería de Tejidos ofrece la posibilidad de crear tejidos urológicos para la reconstrucción vesical. Nuestro objetivo fue generar un dispositivo que contenga una lámina muscular lisa de origen vesical cubierta de urotelio. Para ello se aislaron células musculares lisas y uroteliales de biopsias vesicales. Las células uroteliales se amplificaron utilizando una modificación del método de Rheinwald-Green. Se determinó la permeabilidad selectiva de la lámina de urotelio, se caracterizó su estirpe inmunológicamente y se estudió su cinética de crecimiento. Las células musculares fueron sembradas dentro de una matriz de colágeno I bovino, y dos días después las células uroteliales fueron colocadas encima de dicha matriz. Se logró cultivar, expandir y recolectar grandes cantidades de urotelio estratificado in vitro. Se observó la formación de una pluricapa celular diferenciada con organización polarizada. La lámina demostró funcionar como barrera selectiva de la urea. Se confirmó mediante estudios histológicos, la generación de un dispositivo con una pluricapa de células uroteliales en la superficie y células musculares por debajo. Estos resultados indican que por este procedimiento, las células uroteliales y musculares pudieron ser aisladas, propagadas in vitro y diferenciadas en laminas estratificadas manteniendo su funcionalidad. Esto permite predecir la viabilidad de nuestro dispositivo como un tejido urológico de reemplazo.

BIOLOGÍA GENERAL: CRONOBIOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y BOTÁNICA

825. (6853) MECANISMOS INDUCIDOS POR BACTERIAS PROBIÓTICAS SOBRE EL SISTEMA MUCOSO INTESTINAL. MALDONADO GALDEANO, CAROLINA; PERDIGÓN, GABRIELA

CERELA. *Cát. Inmunología Fac.de Bqca., Qca.y Fcia. UNT.*

Las bacterias probióticas estimulan el sistema inmune de mucosa intestinal de ratón, los mecanismos involucrados no son conocidos. Estudiamos la interacción de *L. casei* CRL 431 (Lc) con epitelio y células inmunes asociadas a intestino en ratones BALB/c. Los animales recibieron vía intragástrica Lc marcado con FITC. Se extrajo intestino delgado entre 5 y 20 min. post-intubación. Se realizó un estudio de inmunomarcación por microscopía electrónica de transmisión (MET) para 10 min. Determinamos sobre células inmunes intestinales CD4, CD8, CD3 y la expresión del receptor manosa CD206 por IFI., posterior a la administración de Lc 10(8) células/ratón durante 2, 5 o 7 días. Observamos células fluorescentes en placa de Peyer y en lámina propia de las vellosidades a los 5 min. de administración. Por MET comprobamos que Lc se adhiere a las microvellosidades de los enterocitos, encontrándose la bacteria entera en la superficie apical de las células. Se encontraron los fragmentos bacterianos en el interior de los enterocitos. Del análisis de los marcadores y receptor encontramos lo siguiente:

Tiempo de administración	CD-4	CD-8	CD-3	CD-206
2 días	25 ± 5	34 ± 9	25 ± 5	44 ± 15 *
5 días	22 ± 6	22 ± 6	42 ± 11	47 ± 13 *
7 días	22 ± 4	26 ± 7	43 ± 9	62 ± 32 *
Control	32 ± 8	28 ± 7	43 ± 10	27 ± 9

Lc interactúa con el epitelio. Sólo fragmentos bacterianos fueron capaces de internalizarse en los enterocitos y tomar contacto con células inmunes induciendo una importante activación de macrófagos por expresión del receptor manosa o CD-206. No se evidenció aumento proliferativo de LT, sin que esto implique menor activación como se demostró en trabajos previos por el estudio de citoquinas liberadas.

826. (6880) ESTIMULACIÓN INMUNE INTESTINAL POR BACTERIAS COMENSALES Y PROBIÓTICAS. DOGI, C. (1); PERDIGÓN, G.

CERELA, Cat. Inmunología, Fac Bqca, Qca. y Fcia. UNT

El efecto inmunomodulador de probióticos sobre el Sistema Inmune de Mucosa intestinal está bien demostrado. Comparamos el efecto de bacterias (bact) indígenas (IN) y exógenas (EX) sobre la inmunomodulación en intestino de ratones Balb/c. *L. fermentum* y *L. acidophilus* aisladas de intestino de ratón (bact. IN) y *L. fermentum* y *L. acidophilus* aisladas de quesos (bact EX), se administraron vía oral durante 2 y 5 días (d) consecutivos en sus dosis óptimas: 10(4) UFC/ml/d para las IN y 10(8) UFC/ml/d para las EX, determinada por ausencia de translocación bacteriana a hígado y bazo. Por marcación con FITC se observó tanto las bact. IN y las EX en Placas de Peyer y nódulos. Por IFI en intestino delgado (ID) e intestino grueso (IG) se determinó número de células (cél) IgA+ y citoquinas proinflamatorias (IFN, TNF, IL6) y regulatorias (IL4, IL10). Todas las cepas ensayadas mostraron aumento de cél IgA+ a los 5 d en ID (control 112±3 Lf IN 150±5 Lf EX 135±4 La IN 157±4 La EX 142±3). Cada cepa mostró un perfil e citoquinas diferente. Sólo las EX incrementaron significativamente el número de cél TNF+ a los 5d en ID (control 24±5 La EX 36±3 Lf EX 37±3). El número de cél IL10+ a los 5d en ID se mantuvo similar al control para Lf EX pero incrementó para el resto (control 26±3 La IN 49±8 Lf IN 68±3 La EX 47±3). El estudio comparativo de estructuras de pared se realizó por SDS-PAGE y microscopía electrónica. Todas las bacterias interactuaron con el sitio inductor en mucosa. El incremento en el número de cél IgA+ es dosis dependiente. La capacidad estimuladora de bact IN y EX es característica de cada cepa e independiente del género o especie. El perfil de citoquinas muestra que las bact EX favorecerían la respuesta innata y que las IN mantendrían la homeostasis del ecosistema intestinal por inducción de citoquinas proinflamatorias. No se observó diferencias estructurales de pared que pudieran indicar una mayor adhesión de las bact IN al epitelio intestinal.

827. (6915) EFECTO INMUNOMODULADOR DE L. CASEI COMO ADYUVANTE ORAL ADMINISTRADO POR PERIODOS PROLONGADOS. CHAVES, S.; BIBAS BONET, M.; MESÓN, O.; PERDIGÓN, G.

CERELA. Cát. Inmunología Fac. Bqca, Qca y Fcia UNT

El efecto inmunomodulador de *Lactobacillus casei* (Lc) administrado oralmente a largo plazo sobre la Inmunidad Sistémica y Mucosa aún no ha sido evaluado. Estudiamos si esta administración induce tolerancia oral. A ratones BALB/c se les administró oralmente Lc en forma cíclica 2 días consecutivos cada cinco días durante 98 días. Estudiamos: Actividad Fagocítica de macrófagos peritoneales; N° cél. IgA+ en Intestino Delgado y Bronquios; citoquinas proinflamatorias (TNF α , INF γ) y reguladoras (IL-10, IL-4) por IF e IgG antiovalbúmina en suero por ELISA.

DÍAS	IgA+/10 camp (Int. Delgado)	IFN-g+/10 camp (Int. Delgado)	TNF-a/10 camp (Int. Delgado)	IL-4/10 camp (Int. Delgado)	IL-10/10 camp (Int. Delgado)	IgA+/10 camp (BALT)	Fagocitosis (%)	IgG Antiovo D.O. 493 nm (control)	IgG antiovo D.O. 493 nm (L.c)
Control	128±10	51±3	24±2	34±9	31±4	44±8	20±1	0.054±0.009 (28 Días)	0.080±0.017 (28 Días)
2	187±10	99±3	50±2	90±9	41±4	171±8	45±1	0.050±0.009 (35 Días)	0.189±0.017 (35 Días)
14	214±10	90±3	58±2	186±9	78±4	118±8	40±1	0.058±0.009 (42 Días)	0.299±0.017 (42 Días)
28	183±10	124±3	75±2	222±9	76±4	76±8	40±1	0.034±0.009 (49 Días)	0.391±0.017 (49 Días)
56	269±10	115±3	55±2	97±9	32±4	65±8	33±1	0.043±0.009 (56 Días)	0.437±0.017 (56 Días)
70	217±10	96±3	49±2	120±9	34±4	63±8	43±1	0.050±0.009 (63 Días)	0.342±0.017 (63 Días)
84	315±10	115±3	44±2	132±9	31±4	48±8	30±1	0.092±0.009 (63 Días)	0.286±0.017 (63 Días)
98	294±10	96±3	45±2	127±9	31±4	62±8	35±1		

Lc activa macrófagos peritoneales, favorece la inmunidad mucosa intestinal mediada por IgA, induciendo su ciclo. El efecto en Bronquios fue de corta duración. TNF-a e INF-g estuvieron aumentadas. IL-4 se mantuvo elevada hasta el final, e IL-10 solo hasta los 28 días. Los niveles de anticuerpo alcanzaron un máxi-

mo y luego disminuyeron. Los resultados indican que la administración prolongada de Lc no indujo tolerancia oral, observándose un efecto inmunoregulatorio mediado por IL-10, manteniendo la Inmunidad Innata. Lc podría ser empleado como adyuvante oral de mucosas.

828. (7532) SÍNTESIS DE MELATONINA Y PERCEPCIÓN DE LUZ EN POLLOS GUCY1 O RD. VALDEZ, DIEGO; GARBARINO-PICO, EDUARDO; GUIDO, MARIO

Dpto. Química Biológica, CIQUIBIC.

El sistema circadiano de vertebrados esta formado por la retina, la glándula pineal y los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos. En Aves, estos componentes interactúan entre sí regulando los ritmos fisiológicos y conductuales. Asimismo, la retina sensa las condiciones ambientales de iluminación y ajusta el reloj interno al fotoperíodo externo y es capaz de oscilar rítmicamente con osciladores localizados en distintas poblaciones celulares. Nuestros estudios aportan las primeras evidencias indicando que las células ganglionares de la retina (CGRs), poseen osciladores endógenos. Además, CGRs de mamíferos poseen el fotopigmento melanopsina y presentan capacidad fotorreceptora intrínseca. Esto explicaría como en individuos ciegos, que carecen de sus fotorreceptores clásicos, la luz ajusta sus ritmos fisiológicos. En relación a esto, se ha caracterizado un modelo de pollos ciegos portadores de la mutación GUCY1 que presentan ceguera desde el nacimiento y degeneración de sus células fotorreceptoras. Objetivos: Se investigó en pollos Serotonina N-acetil transferasa (AANAT, clave en la síntesis de melatonina) y la capacidad de los mismos de percibir luz mediante estudios en los ritmos de ingesta de alimentos bajo condiciones variantes de iluminación con o sin su pineal cubierta, y el reflejo pupilar cuando se ilumina el ojo opuesto. Resultados: En 30 días de registro los animales respondieron a los cambios realizados en el ciclo de luz y presentaron contracción de sus pupilas en un 65 %, indicando que algunas células de la retina interna poseen capacidad fotorreceptora. Los perfiles de actividad AANAT en pollos de 10 días fueron menores comparados a los controles, pero en ambos casos fue mayor la actividad enzimática durante el tiempo diurno, opuesto a lo que ocurre en células fotorreceptoras, lo que sugiere un mecanismo temporal opuesto de síntesis de melatonina en las CGRs. En ausencia de fotorreceptores el sistema circadiano defotorrección es funcional en pollos GUCY1.

829. (7609) ROL DE LA RETINA INTERNA EN EL SISTEMA CIRCADIANO. CONTIN, MARIA ANA; NIETO, PAULA SOFIA; CARPENTIERI, AGATA RITA; GARBARINO-PICO, EDUARDO; GUIDO, MARIO EDUARDO

Fac. de Cs. Químicas. UNC

Los ritmos circadianos tienen periodicidad cercana a 24 horas, están generados por un sistema de osciladores centrales y periféricos que regulan la fisiología de los organismos. El núcleo supraquiasmático (NSQ) es el reloj central que sincroniza los osciladores periféricos con el exterior. La retina es el la encargada de receptor las condiciones externas de iluminación y transmitir las al NSQ. Si bien fotorreceptores son los especializados en la fotorrección, se ha demostrado que animales que carecen de estas células, perciben luz y ésta puede sincronizar sus ritmos. En mamíferos se ha observado que las células ganglionares (RGCs) que proyectan al NSQ son fotosensibles y poseen un fotopigmento melanopsina, postulándolas como las encargadas de la fototransducción. En nuestro laboratorio se demostró que RGCs de pollos de 10 días y de cultivos de embriones de 8 días sintetizan melatonina con niveles máximos durante el día. Cambios similares se observaron en los niveles del RNA, de la actividad de una de las enzimas claves para su síntesis (AA-NAT) y de un mensajero secundario AMPc. Se vio por Northern blot la presencia del transcrito del melanopsina y por hibridización in situ se pudo observar que éste se localiza especialmente en CGRs. La expresión

de este ARNm en los cultivos difiere largo del tiempo con máxima expresión entre 24 y 32 h después de la sincronización. Para realizar los cultivos fue necesario obtener RGCs aisladas del resto de la retina, debido a esto, se purificaron por inmunopanning, para la cual generamos anticuerpos contra una glicoproteína de membrana. De esta forma, se obtuvieron cultivos de RGCs muy homogéneos. Por último, experimentos de electrofisiología demostraron que dichas células presentan actividad eléctrica a partir del estadio embrionario E8 con mayor expresión o mayor actividad de los canales de K cuanto mayor es el estadio embrionario. Los resultados son la primera descripción de la presencia de relojes biológicos en RGCs sugiriéndonos un rol en la fototransducción.

830. (7851) ESTUDIO COMPARATIVO DE CULTIVOS DE CGRS DE POLLOS DE GENOTIPOS SALVAJE Y GUCY*1.
NIETO, PAULA SOFÍA; GUIDO, MARIO EDUARDO

CIQUIBIC-Fac. de Cs. Químicas-UNC.

La retina es un oscilador del sistema circadiano de vertebrados que regula y sincroniza los ritmos biológicos diarios. En mamíferos la sincronización por luz persiste en ausencia de las células fotorreceptoras (CFRs), sugiriendo que los mecanismos de fotorrecepción visual clásicos y circadianos siguen vías diferentes. En este contexto, las células ganglionares (CGRs) tendrían un protagonismo especial ya que un grupo de CGRs es sensible a la luz. Una herramienta clave para realizar estudios sobre los mecanismos de fotorrecepción y regulación circadiana son los modelos de degeneración retiniana, como el GUCY1* en pollos (llevan una mutación en el gen de la Guanilato Ciclasa, que impide la fototransducción visual y provoca la degeneración de CFRs). Se desea investigar a las CGRs como osciladores circadianos autónomos y fotosensibles en embriones de pollos de 8 días de genotipos salvajes y GUCY*1, para lo cual planteamos como primer objetivo la caracterización de estos cultivos. En el estadio embrionario E8 las únicas células diferenciadas en las retinas de pollos son las CGRs. Esto nos permitió desarrollar el método de inmunopanning y purificar CGRs de pollos de ambos genotipos con anticuerpos que reconocen la proteína Thy-1 presente en las CGRs en este estadio. Las CGRs-Thy-1+ se cultivaron durante 1 día observándose en ambos grupos una notable formación de procesos. La caracterización mediante inmunocitoquímica y Western Blot utilizando marcadores específicos (Rodopsina Quinasa para CFRs, Parvalbúmina para células de la capa nuclear interna y Gap-43 para CGRs), revelan similitudes entre ambos genotipos en la morfología celular y en el alto nivel de pureza de los preparados: más del 90% de las células fueron positivas para Gap-43 mientras que las células positivas para Parvalbúmina no superan el 8% y menos del 2,5 % fueron positivas para Rodopsina Quinasa. Nuestros resultados demuestran que los cultivos de CGRs de ambas cepas de pollos en E8 presentan una pureza mayor al 90%.

831. (7880) BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILCOLINA EN CÉLULAS EN CULTIVO. CONTROL CIRCADIANO POR PROTEÍNAS RELOJ. MÁRQUEZ, SEBASTIÁN; GUIDO, MARIO E.

Ciquibic- UNC

El sistema temporal circadiano en mamíferos está compuesto de numerosos osciladores celulares distribuidos por todo el cuerpo y de un marcapaso central, que controlan la fisiología y el comportamiento. Recientemente hemos demostrado que cultivos de fibroblastos NIH 3T3-quietes sincronizados por un shock de suero de caballo al 50% por 2 horas presentan oscilaciones diarias en la biosíntesis de fosfolípidos y en la expresión del gen reloj *Period 1* (Márquez et al. Faseb 2004). La oscilación en la biosíntesis de lípidos totales observó después de administrar distintos precursores radioactivos. Fosfatidilcolina (PC) es uno de los fosfolípidos esenciales en células de mamíferos, representando « el 50% de las membranas y cumpliendo numerosas funciones en la señalización celular. Su síntesis controlada en forma limitante por una enzima altamente regulada: CTP-Phosphocholine cytidyltransferase (CT). Nuestros datos mues-

tran que la biosíntesis de PC oscila en forma diaria. Nuevos resultados revelan que la actividad enzimática de la CT presenta cambios diarios significativos en cultivos de fibroblastos NIH 3T3 sincronizados con suero de caballo. ($F= 2,3301$; $p < 0.009647$). Datos preliminares nos revelan que el tratamiento de los cultivos con 4nmoles/ml de Oligonucleótido antisense a la secuencia de mPer1 eleva los niveles basales de actividad enzimática de la CT. Próximos estudios investigarán si estos cambios se deben a variaciones en el mRNA y/o en la proteína de esta enzima o a algún mecanismo regulatorio de la actividad enzimática. Palabras claves: PC, CTP: fosfocolina- cytidiltransferasa, ritmos circadianos, fosfolípidos, fibroblastos. antisense

832. (7892) PARTICIPACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA REPLICACIÓN DEL VIRUS. CRESPI, GABRIELA NOEMI*; MLEWSKI, ESTELA CECILIA; PAGLINI, SEVERO; PAGLINI, GABRIELA*

Inst. de Virología Fac.Cs.Med - UNC e Instituto Ferreyra INIMEC-CONICET*

El virus Pixuna (vP) (Alphavirus) presenta genoma de ARN, replicación perinuclear, maduración por brotación, proteínas estructurales de la cápside (C) y de envoltura (E1 y E2). Estudios previos han demostrado que componentes del citoesqueleto de actina son necesarios para la replicación, morfogénesis y liberación de algunos virus, y la depolimerización de actina mediante el uso de drogas afecta el proceso de maduración y salida de los viriones. En éste trabajo se analizó la posible participación del citoesqueleto de actina en la replicación del vP. La infección de la célula huésped con vP afecta su morfología, éstas se redondean, los filamentos de actina se desorganizan formando un cinturón subcortical y los microtúbulos se disponen en forma concéntrica hacia el interior de la célula. Para investigar la posible participación de los filamentos de actina en la maduración y brotación del vP, células Vero fueron infectadas con vP y el medio de cultivo fue suplementado con cytochalasina B. Los sobrenadantes fueron tomados a diferentes horas post-infección y los títulos infectivos se determinaron por ensayo de placa. Estos experimentos mostraron una significativa disminución de los títulos virales a partir de las 8hs post-infección llegando a reducirse en un 70% a las 24hs. Para determinar la posible asociación de las proteínas del vP con los filamentos de actina, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de actina a partir de un lisado de células Vero infectadas. Las proteínas E1 y E2 coimmunoprecipitan con actina, mientras que la proteína C no está presente. Nuestros resultados sugieren una interacción entre las proteínas de la envoltura del vP con los filamentos de actina, quienes participarían en el movimiento de E1 y E2 hacia sus sitios de localización final, para permitir la brotación de los viriones. El tratamiento de células infectadas con cytochalasina previene la liberación de los viriones, sugiriendo que un citoesqueleto de actina intacto es esencial para que el vP ensamble y brote de la célula.

833. (7895) EFECTO DEL HIERRO SOBRE EL CRECIMIENTO DE EJES EMBRIONARIOS DE SOJA. ROBELLO, ELIZABETH; GALLEANO, MONICA; PUNTARULO, SUSANA

Fisicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina.

El pool de Fe lábilmemente unido constituye la fracción del Fe total disponible para catalizar reacciones oxidativas. Se estudió el efecto de la suplementación con Fe sobre el contenido de Fe lábilm celular. Se emplearon semillas de soja (*Glycine max*, var Hood) incubadas a 28°C durante 2 a 48 h en cámara húmeda y el Fe fue suplementado como Fe:EDTA (1:2). El contenido total de Fe en los ejes durante la imbibición fue medido mediante la formación del complejo Fe²⁺-batofenantrolina, previa mineralización de las muestras con nítrico:perclórico (1:1). El pool de Fe lábilm fue determinado mediante espectrometría de resonancia paramagnética (EPR) a 77 K, empleando deferoxamina (DF) para generar el complejo Fe³⁺-DF que produce una señal de EPR a g=4.3. El Fe total en los ejes no suplementados con Fe (control) y suplementa-

dos con 50 μM y 500 μM Fe no mostró diferencias significativas en ejes desarrollados durante 2 a 24 h. Al cabo de 48 h de imbibición los ejes suplementados con 500 μM Fe duplicaron el contenido de Fe, expresado en función de mg de peso fresco, en comparación con el contenido de Fe en los ejes controles. El Fe lábil en los ejes controles y suplementados con 50 μM no mostró diferencias significativas (20-30%) durante 2 a 48 h de imbibición. A las 24 h de imbibición los ejes suplementados con 500 μM Fe mostraron un contenido de Fe, expresado en función de mg de peso fresco, de 1-2 veces superior al de los ejes no suplementados y a las 48 h el aumento resultó de 6-8 veces en el contenido de Fe lábil en comparación con el contenido de Fe en los ejes controles. Los datos sugieren que los ejes controlan eficientemente la incorporación de Fe y sólo al cabo de 48 h se registra un aumento significativo del contenido de Fe total frente a la oferta elevada de Fe exógeno. El incremento en el contenido de Fe total se refleja en un aumento drástico del contenido de Fe disponible para la catálisis de reacciones oxidativas, que favorecería la aparición de daño celular. Finaciado por ANPCyT, CONICET y la UBA.

- 834. (8149) ESTUDIO DE LÁTEX NATURAL. CARACTERIZACIÓN DE SUS PROTEÍNAS.** MINISINI, ANTONELA*; BERTOLUZZO, STELLA MARIS**; BERTOLUZZO, MARÍA GUADALUPE**; RIGATUSO, RUBEN**; QUATTRIN, FABIO**; CORCHS, JUAN*

*Fac. Cs. Médicas. UNR, **Fac. Cs. Bioq. y Farm.- Suijacha 531. (2000) Rosario

El látex, llamado así por su aspecto lechoso, es producido en la naturaleza por gran variedad de plantas, entre ellas la higuera y el gomero, especies presentes en nuestro hábitat. Básicamente está constituido por agua y polímeros de cis-1-4 polisopreno (goma natural) además de pequeñas cantidades de glúcidos, lípidos, proteínas y moléculas inorgánicas. El contenido de proteínas en el látex es bajo pero su diversidad es alta. Se ha demostrado que un porcentaje de éstas constituyen alergénicos. Por ello es habitual el empleo de extractos de látex natural estandarizados, destinados al diagnóstico y tratamiento de su alergia. Actualmente se dispone en Europa de distintos extractos comerciales pero uno solo de ellos está estandarizado. Nuestro trabajo consistió en la caracterización de las proteínas del látex natural de higuera (*Ficus carica*) y de gomero, mediante la técnica de electroforesis. Las muestras de látex se obtuvieron mediante una incisión en el tallo de las respectivas plantas, recolectando el líquido en pequeños recipientes que contenían amoníaco para evitar su coagulación y la contaminación bacteriana. Se utilizó la técnica de proteinograma electroforético para realizar una electroforesis de las muestras obtenidas. Una vez seca la tira, se realizó el test de proteínas totales y se observó en un densitómetro para registrar la intensidad de tinción de las distintas fracciones proteicas mediante una serie de curvas que indican las proporciones relativas de cada una. Se dispone de mezclas de proteínas de peso molecular conocido, que permiten obtener una tinción uniforme. Por medio de la técnica de electroforesis de proteínas hemos podido concluir a través de la densitometría, que las muestras de látex estudiadas presentan alrededor de 20 proteínas diferentes. Además observando la dirección hacia la cual se produjo el movimiento, también podemos asegurar que las proteínas del látex tienen una carga predominantemente negativa.

BIOLOGÍA MOLECULAR - GENÉTICA 3

- 835. (6609) Distrofia Muscular de Duchenne / Becker Diagnóstico Molecular en Familias.** FERREIRO, VERONICA; GILIBERTO, FLORENCIA; SZIJAN, IRENE

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

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes (1:3500). Producida por mutaciones en el gen de la distrofina (Xp21), es recesiva, ligada al X, progresiva y de evolución fatal. Es muy importante evaluar la posibilidad de que una mujer con antecedentes familiares de la patología pueda ser portadora de la mutación para poder ofrecer un consejo genético adecuado a cada familia. El objetivo de esta investigación radica en la determinación del estado de portador de la mutación de los integrantes de una serie de familias con afectados de DMD/BMD. Se analizaron un total de 200 muestras provenientes de 41 familias argentinas con antecedentes (17 casos familiares y 24 esporádicos). El método de elección para realizar este estudio se basó en el análisis de la segregación de los cromosomas X maternos mediante el uso de hasta 11 STRs (secuencias polimórficas (CAN)) ubicados a lo largo del gen de la distrofina. Se pudo determinar el estado de portadora de casi la totalidad de las mujeres. Se evidenciaron eventos de recombinación, mosaicismo germinal, mutaciones de novo, retracciones y elongaciones de Strs. Se analizaron exitosamente vellosidades coriónicas y mujeres sintomáticas. Se demuestra que el estudio de microsatélites es una excelente herramienta molecular para determinar el estado de portador de la mutación aún sin conocerla, tanto en casos esporádicos como familiares de Distrofia Muscular de Duchenne / Becker, teniendo o no afectado con vida y permitiendo también estudios prenatales.

- 836. (6651) NEUROFIBROMATOSIS TIPO I: DIAGNOSTICO MOLECULAR FAMILIAR.** FERREIRO, VERONICA; GILIBERTO, FLORENCIA; DALAMON, VIVIANA; FERNANDEZ, CECILIA; SZIJAN, IRENE

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. El objetivo del presente trabajo fue confirmar la utilidad de los STR's como herramienta molecular diagnóstica en los casos de neurofibromatosis familiar, y su posterior implementación como tal. 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 familiares de NF1. Se analizaron doce familias con NF1 familiar. Dos de ellas con diagnóstico clínico de NF1 de todos los integrantes analizados con el objeto de confirmar que todos ellos comparten el mismo haplotipo y demostrar la utilidad de las herramientas utilizadas. También se analizaron dos tumores y se realizó un estudio prenatal. Resultados: El estudio de segregación de alelos polimórficos resultó informativo para todas las familias analizadas. Se pudieron identificar portadores de la mutación, excluir a familiares en riesgo, identificar cromosomas ligados a la mutación por comparación de haplotipos de afectados o por evidenciarse pérdida de heterocigosidad en el tumor, y en algunos casos, hacer un seguimiento clínico posterior para avalar los resultados moleculares obtenidos. Se quiere recalcar la importancia del estudio molecular como herramienta diagnóstica en los casos de neurofibromatosis tipo I familiar.

- 837. (7111) GENES DE RIESGO PARA DEFECTOS DE CIERRE DEL TUBO NEURAL (DCTN) EN ARGENTINA.** BUZZALINO, NOEMÍ; CORTESE, RENÉ; BRONBERG, RUBÉN; MERCADO, GRACIELA; GOLDSCHMIDT, ERNESTO*; LIASCOVICH, ROSA; DAIN, LILIANA

Centro Nacional de Genética Médica (ANLIS), *Servicio de Genética Hospital Fernández

Se ha sugerido que variantes alélicas de los genes codificantes de las enzimas que intervienen en la conversión/degradación de la homocisteína/metionina, estarían asociadas a DCTN. El objetivo del trabajo fue estudiar la asociación entre las variantes del gen metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) C677T y A1298C, la inserción de 68 pb (ins68pb) del gen cistationina-beta sintetasa (CBS) y el riesgo a desarrollar DCTN en nuestra población. Se analizaron 100 pacientes (P) y 181 individuos controles (C). La genotipificación se realizó por PCR y, para las variantes de MTHFR, posterior digestión con Hinf I y MbolI. Para el genotipo 677TT, se hallaron frecuencias de 0,25 y 0,12 en P y C, respectivamente (OR=2,54; IC95%: 1,28-5,08). Para los genotipos 1298CC+CA se hallaron frecuencias de 0,36 y 0,39 en P y C, respectivamente (OR=0,88; IC95%: 0,50-1,56). Para la ins68pb las frecuencias halladas fueron de 0,13 y 0,12 en P y C, respectivamente (OR=1,05; IC95%: 0,47-2,33). La asociación entre 677TT y la ocurrencia de DCTN no se modificó tras el ajuste por las variantes de MTHFR 1298 (OR=2,34; IC 95%=1,03-5,38), ni tras el ajuste por la ins68bp en CBS (OR=2,79; IC95%:1,29-6,04). Al analizar los diferentes genotipos en MTHFR 1298, se ha observado una distribución de individuos significativamente diferente a la esperada según el modelo de Hardy-Weinberg (observados: AA=152; AC=90; CC=3; esperados: AA=158,27; AC=77,17; CC=9,31; Chi-(2)=6,66; p<0.01). Todos los individuos con genotipo de MTHFR 1298CC, poseen además el genotipo 677CC. Nuestros resultados sugieren que el genotipo 677TT de MTHFR es el genotipo asociado con el desarrollo de DCTN. Por otro lado, el presente trabajo podría contribuir a sustentar la hipótesis que el genotipo 1298CC de MTHFR sería letal en presencia de la variante de riesgo de MTHFR 677.

838. (7115) ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN GJB2 EN PACIENTES HIPOACÚSICOS CONGÉNITOS. DALAMÓN, VIVIANA (1); DIAMANTE, VICENTE (2); DIAMANTE, FERNANDO (2); BEHERAN, AGUSTINA (2); PALLARES, NORMA (2); ELGOYHEN, ANA BELEN (1)

(1) Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, INGEBI (UBA-CONICET), (2) Centro de Implantes Cocleares, Prof. Vicente Diamante

La hipoacusia hereditaria no sindrómica afecta a 1:2500 nacidos vivos. Mayormente se debe a la forma autosómica recesiva (80%). Las mutaciones en el gen GJB2 el cual codifica para la conexina 26 (13q11.12) son responsables de la mayoría de las sorderas severas-profundas prelinguales (50%). Se han reportado más de 50 mutaciones en el gen GJB2, algunas predominan étnicamente sobre otras, como la delección 35delG en europeos mediterráneos, la 167delT en judíos Askenazis y la 235delC en la población japonesa. El objetivo del presente trabajo fue detectar mutaciones en el gen GJB2 en pacientes con hipoacusias bilaterales severas-profundas congénitas y prelinguales derivados para implante coclear. Se purificó ADN de leucocitos de sangre periférica de 23 pacientes y de sus familiares directos (12 miembros), conformando un total de 35 muestras. Para poner de manifiesto cada una de las mutaciones se realizó: a) PCR alelo específica para la mutación 35delG, b) PCR-RFLP para la mutación 167delT y c) secuenciación directa de toda la región codificante y regiones aledañas no codificantes del gen GJB2 para identificar mutaciones desconocidas. Un alto porcentaje de pacientes analizados (70%) presentaron mutaciones en el gen GJB2. La mutación 35delG fue identificada en 6 de los 23 afectados, dos de ellos homocigotas, dos compuestas heterocigotas (35delG/W77R, 35delG/V27I), y dos heterocigotas sin otra mutación identificada en GJB2. La mutación 167delT no fue identificada en ninguno de los pacientes de este grupo. Mediante secuenciación directa se identificaron otras 7 mutaciones (T8M, I23M, L25V, D2E, IVS1-14G>C, IVS1-24A>C, E47X). Estos resultados confirmarían que un alto porcentaje de pacientes con hipoacusias severas presentan mutaciones en el gen GJB2. Cabe destacar que las mutaciones T8M, I23M, L25V, D2E, IVS1-

14G>C, IVS1-24A>C no han sido previamente descriptas en otras poblaciones y resultaría de interés estudiar su efecto sobre la funcionalidad de la conexina 26.

839. (7279) MAYOR HIPERGLUCEMIA SE ASOCIA CON SUPERIORES PESOS AL DESTETE Y EN LA ADULTEZ. CLUSTERS MULTIVARIADOS CONSTRUÍDOS EN DOS MODELOS MURINOS DE DIABETES. MONTENEGRO, SILVANA MARISA; MÉNDEZ, FERNANDA; PICENA, JUAN CARLOS; MARTÍNEZ, STELLA MARIS; *TARRÉS, MARÍA CRISTINA

Facultad de Ciencias Médicas. *CIUNR. UNR.

El peso en edades tempranas es considerado un marcador del desarrollo de diabetes, por lo que resultó de interés el estudio de esta relación en los modelos murinos de diabetes espontánea eSS y eSMT. Se efectuó un análisis factorial de componentes principales, técnica multivariada de correlación, en 527 machos tomando como variables activas los pesos (g) al nacimiento (PN), al destete (PD) y adulto (P) y las glucemias (mg/dl) basal (G0) y a los 30 (G30), 60 (G60) y 120 (G120) min de sobrecarga glucídica y como ilustrativas PD-PN, P-PD, insulinemia tras sobrecarga (I120: µUI/ml) y línea genética. Los dos primeros componentes explicaron el 74% de la variancia total siendo CP1=0.37G0+ 0.51G30+ 0.53G60+0.48G120+ 0.31P y CP2=0.44G0-0.23G30-0.34G60-0.22G120+0.76P. Aplicando las técnicas de clasificación sobre las coordenadas de los individuos en los ejes factoriales, las unidades de análisis se agruparon en dos clusters, incluyendo el primero el 43% de los animales, principalmente de la línea eSMT, con G0 (media ± desvío estándar:123 ± 30), G30 (312 ± 52), G60 (387 ± 56), G120 (290 ± 61), P (358 ± 43), PD (36 ± 7), PD-PN (30 ± 4), P-PD (322 ± 11) e I120 (41 ± 6) superiores (p=0) al promedio general y el segundo, formado por ratas eSS con los menores valores (p=0) de glucemias (G0: 95 ± 22, G30: 226 ± 44, G60: 268 ± 53, G120: 199 ± 21), I120 (25 ± 7), biomásas (P: 318 ± 41, PD: 33 ± 6) e incrementos de peso(PD-PN: 26 ± 5, P-PD: 288 ± 32). Dado que en ambos modelos se han constatado previamente rasgos de eficiencia que indicarían la presencia de genes «thrifty» y considerando que las hipótesis del genotipo y fenotipo ahorrrativo y del fenotipo robusto son explicaciones no excluyentes, los datos aquí presentados aportarían apoyo a la última. La historia de la evolución del peso podría tener importancia en la detección de individuos en riesgo de desarrollar, acelerar o exacerbar resistencia a la insulina y diabetes.

840. (7494) MUTACIONES EN LAS CONEXINAS 26 Y 30 EN NIÑOS CON SORDERA NO SINDRÓMICA. GRAVINA, LUIS PABLO; PRIETO, MARIA EUGENIA; GARRIDO, JENNIFER; FONCUBERTA, MARIA EUGENIA; HUGO, MARTIN; BARREIRO, CRISTINA; CHERTKOFF, LILIE

Hospital de Pediatría «Prof. Dr. Juan P. Garrahan»

Las mutaciones en la Conexina 26 (Cx26) son responsables de hasta un 50% de las sorderas no-sindrómicas recesivas (SNSR); siendo 35delG la más frecuente. Recientemente se identificó en población española una delección de 342Kb en el gen de la Conexina 30 (Cx30) que suele acompañar una mutación en Cx26. En nuestra población, un estudio preliminar de mutaciones en Cx26, mostró una alta prevalencia de 35delG y la presencia de 167delT. El objetivo de este trabajo fue determinar la contribución de las mutaciones en Cx26 y Cx30 en el desarrollo de SNSR en Argentina. Para ello se estudiaron 36 niños con hipoacusia neurosensorial no-sindrómica severa a profunda atendidos en nuestro hospital. Las mutaciones 35delG y 167delT se analizaron mediante PCR y digestión con las enzimas BslI y PstI, respectivamente. La delección de Cx30 (del342Kb) se estudió por PCR multiplex con primers que amplifican la secuencia normal y secuencias adyacentes a la delección. En los heterocigotas se secuenció la región codificante de Cx26 para la búsqueda de mutaciones raras. Se detectaron mutaciones en 24 de los 72 alelos analizados. Se estableció el genotipo completo en 11 pacientes y en 2 se identificó una sola mutación (35delG): 5 pa-

cientes resultaron homocigotas 35delG, 1 homocigota del342Kb, 2 doble-heterocigotas (35delG/del342Kb) y 3 heterocigotas compuestas (35delG/167delT, 35delG/R143W, 167delT/V371). Estos resultados permiten concluir que las mutaciones en Cx26 y Cx30 son una importante causa de SNSR en nuestra población. La presencia de del342kb en el 5,6% de los alelos analizados sugiere que el estudio de la Cx30 debería formar parte del diagnóstico molecular de pacientes con hipoacusia neurosensorial no-sindrómica. La incorporación de 167delT y del342Kb al diagnóstico de esta patología aumenta significativamente el número de pacientes detectados con genotipo completo.

841. (7556) ANALISIS DE INESTABILIDAD DE MICROSATELITES EN ENFERMEDAD CELIACA. FUNDIA, ARIELA (1); COTTLIAR, ALEJANDRA (1); LA MOTTA, GRACIELA (2); VIOLA, MARTÍN (2); GÓMEZ, JUAN CARLOS (2); SLAVUTSKY, IRMA (1); LARRIPA, IRENE (1)

(1) Depto. de Genética, Academia Nacional de Medicina, (2) HIGA «Gral. San Martín», La Plata

La mayoría de las neoplasias presentan algún tipo de inestabilidad genética ya sea cromosómica (CIN) o de microsatélites (MSI). La enfermedad celiaca (EC) es un desorden multifactorial que exhibe CIN y predisposición al desarrollo neoplásico. El objetivo del trabajo es establecer si la EC también tiene MSI causada por mutaciones en los genes de reparación del mismatch (MMR). Se estudiaron muestras apareadas de biopsias de intestino delgado y sangre periférica (SP) de 10 pacientes al diagnóstico. La extracción de ADN se realizó con fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) previa digestión con proteínaasa K. Se seleccionaron 5 microsatélites: BAT25, D18S58, D6S267, GSTP y TP53. Los microsatélites BAT25 y D18S58 se eligieron del panel de referencia de MSI para los tumores asociados a neoplasias colónicas; D6S267 coincide con un sitio de roturas cromosómicas común en EC (6q21); GSTP está ubicado en el gen GSTP de quimiorresistencia y TP53 está incluido en el locus del supresor p53. La amplificación se efectuó por PCR touchdown en la que se disminuye la temperatura de annealing de 65 a 55°C. La PCR se efectuó en 25µl con 1,0mM Cl₂Mg, 100µM dNTPs, 0,4-0,8µM primers, 1U de Taq polimerasa y 200ng de ADN. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (17%) durante 8-10hs a 400 V coloreados con plata (0,1%). En general se detectó un bajo nivel de alteraciones de estos microsatélites, evidenciable por cambios en la longitud de las secuencias repetitivas. Un paciente presentó amplificación de un alelo de TP53 en la biopsia respecto de los alelos constitutivos de SP. Otros 2 casos presentaron pérdida de heterocigosis en TP53 y GSTP. Estos resultados sugieren que la EC es una entidad caracterizada por CIN y no asociada a MSI ni a un sistema MMR defectuoso. El hallazgo de 2/10 casos (20%) con alteraciones en el microsatélite TP53 sugeriría la existencia de pacientes que podrían presentar mutaciones en este gen supresor de tumor.

842. (7627) FRECUENCIA DE PORTADORES DE LA MUTACIÓN 35DELG (CONEXINA 26) EN POBLACIÓN ARGENTINA. GRAVINA, LUIS PABLO; FONCUBERTA, MARIA EUGENIA; BARREIRO, CRISTINA; CHERTKOFF, LILIE.

Hospital de Pediatría «Prof. Dr. Juan P. Garrahan»

La sordera congénita afecta aproximadamente 1/1000 nacimientos, de los cuales el 50% tiene una causa hereditaria. De ellos, alrededor del 80% son no-sindrómicos y de herencia autosómica recesiva. Aunque se han identificado otros genes que causan sordera no-sindrómica recesiva (SNSR), las mutaciones en el gen de la Conexina 26 (GJB2) son la causa más importante. La mutación más frecuente de este gen, 35delG, se encuentra en la mayoría de los alelos afectados en diferentes grupos étnicos, representando más del 70% en poblaciones caucásicas de Europa y Norteamérica con una frecuencia de portadores de 1,3 a 4%. Esta mutación parece ser frecuente en Argentina; una comunicación previa mostró una frecuencia alélica de 0,24 en

un grupo de pacientes con SNSR. El objetivo de este trabajo fue investigar la frecuencia de portadores de la mutación 35delG en población argentina. Para ello se estudiaron 215 muestras de ADN de sujetos sanos provenientes del banco de sangre de nuestro hospital. Las muestras fueron analizadas mediante PCR y posterior digestión con la enzima BstII. Se detectaron 4 heterocigotas 35delG, arrojando una frecuencia de portadores de 1,86% (1/54). La población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Estos primeros resultados muestran que la mutación 35delG tiene una alta prevalencia en nuestra población. La frecuencia de portadores es similar al promedio de la población europea (1/51) y tiende a ser levemente inferior a la de poblaciones mediterráneas como Italia (1/32) y España (1/43). A partir de estos datos y de acuerdo la tasa de natalidad de nuestro país, se esperaría el nacimiento de 60 niños homocigotas 35delG por año; lo que representa, para nuestra población, la mitad de los casos de sordera no-sindrómica recesiva debidos a mutaciones en los genes de conexina.

843. (7783) ESTUDIO INTERDISCIPLINARIO DE CORRELACIÓN CLÍNICO-ETIOLÓGICA EN 91 NIÑOS CON SÍNDROME DE PRADER WILLI (SPW). TORRADO, M; CHERTKOFF, L; BAIALARDO, E; ARAOZ, V(1); ABRALDES, K(2); KROCHIK, G; OZUNA, B(3); CAINO, S; FANO, V(4); MAZZA, C(3)

Hospital Garrahan. (1)Servicio de Genética, (2)Clínicas Interdisciplinarias, (3)Nutrición, (4)Crecimiento y Desarrollo

SPW es una enfermedad multisistémica. Las bases genéticas son complejas: a)deleción q11-13 del cromosoma de origen paterno, b)disomía uniparental materna (DUPm) y c) mutación centro de imprinting(mCI). Objetivo: para contribuir a delinear y entender como las diferentes etiologías se expresan en el fenotipo realizamos estudio de correlación clínica-etiológica en SPW seguidos por un equipo interdisciplinario. Métodos: se diagnosticaron 91 pacientes con test de metilación y se establecieron los subtipos genéticos con FISH y análisis de microsatélites. Variables estudiadas: signos del Consenso diagnóstico PW, edades parentales, antropometría, metabolismo de los hidratos de carbono; Cociente Intelectual(CI) Conducta adaptativa(CA) evaluados por test de Terman y Vineland. Resultados: X de edad 4.09 años. Etiología :59 PW tenían deleción, 30 DUPm y 2 mCI. Para correlacionarlos consideramos 2 grupos: a)delecionados y b)no delecionados. Observamos incremento de edad materna en el grupo b), p<10(-8). De 27 signos del Consenso encontramos diferencias significativas en: hipopigmentación p<15(-4), sonda nasogástrica (p=0.04), apneas (p=0.03) y defectos articulación de la palabra (p=0.01) siendo más frecuentes en el grupo a. CI: 9.52% de los delecionados tenían CI = 70(-2DS de la media) mientras un 61.53% de los b) tenían CI =70 (p=0.001). Resultados similares se obtuvieron con CA: 33.33% del grupo a tenían CA 70 mientras el 71.42% de los b) tenían CA =de 70(p=0.027). Conclusión: La edad materna avanzada facilita la DUPm. Se observó mayor compromiso en el grupo delecionado de algunas funciones relacionadas con el SNC (CI, CA, apneas, uso de sonda nasogástrica). Estos hallazgos podrían explicarse por una expresión diferencial entre los distintos subtipos genéticos de los genes con función cerebral involucrados en PW. Estos resultados permitieron establecer guías de seguimiento y tratamiento adecuadas a cada grupo y efectuar un correcto asesoramiento familiar.

844. (7841) CLONADO, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO CONSERVADO DE LAS VARIANTES DE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2. CASTRO-PARODI, MAURICIO (1); PISTONE CREYDT, VIRGINIA (1); GIOFFRÉ, ANDREA (2); CATALDI, ANGEL (2); IBARRA, CRISTINA (1).

(1) Lab. de Fisiopatología, Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA Paraguay 2155 7mo piso Capital. (2) Inst Biotecnología, INTA Castelar

E. coli enterohemorrágica (EHEC) ingresa al organismo por vía oral, coloniza el intestino grueso y secreta la toxina Shiga tipo 1 y 2 (Stx1, Stx2). Esta toxina está constituida por una subunidad A y cinco B que forman una estructura pentamérica. El objetivo del presente trabajo fue obtener una proteína recombinante de la subunidad B de Stx2 para ser confrontada con una librería de péptidos y detectar aquellos que neutralicen la acción de la toxina. El primer paso fue seleccionar una secuencia conservada entre las distintas variantes de las subunidades B (Stx2 Bcons) mediante un alineamiento de secuencias usando el método Clustal W. Luego se amplificó la zona conservada por PCR a partir del uso de un par de oligonucleótidos «primers» diseñados a tal fin. El producto de PCR se clonó en el vector pRSET-A y con esta construcción se transformó *E. coli* BL-21. Luego se analizó la expresión de Stx2 Bcons en cultivos de bacterias recombinantes en su fase exponencial inducidas por 1 mM IPTG durante 4 horas. Análisis preliminares de Western blot mostraron bandas que corresponden con las formas monomérica, dimérica y pentamérica de la proteína expresada por el gen recombinante. La proteína se purificó por cromatografía de afinidad mediante el uso de columnas de Ni-agarosa. La siguiente etapa consistirá en realizar ensayos de neutralización del efecto de Stx2 B en células epiteliales intestinales y renales.

BIOLOGÍA MOLECULAR 4: TEORÍA Y MODELADO

845. (7070) ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA FARNESIL PIROFOSFATO SINTASA DE TRYPANOSOMA CRUZI POR BISFOSFONATOS. SIGMAN, LUCAS(1); SANCHEZ, VERÓNICA; TURJANSKI, ADRIÁN.

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, (1) Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, FCEyN, UBA.

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* que actualmente afecta a 16-18 millones de personas en América Latina. Diversas drogas contra el parásito están siendo estudiadas en la actualidad, entre ellas los bisfosfonatos. Hasta el momento se sintetizaron varios bisfosfonatos que han mostrado tener una potente actividad tanto in vivo como in vitro. Estas drogas son inhibidores de la enzima farnesil pirofosfato sintasa (FPPS) de *Trypanosoma cruzi*. Recientemente se ha cristalizado la enzima FPPS en *E. coli*, *S. aureus* y *Avian*. En este trabajo hemos estudiado mediante técnicas de bioinformática estructural la enzima FPPS de *Trypanosoma cruzi* y su inhibición mediante bisfosfonatos alifáticos y aromáticos. Se realizó un estudio estructural de la enzima FPPS de *Trypanosoma cruzi* mediante técnicas de modelado comparativo. La estructura se relajó mediante dinámica molecular clásica utilizando el campo de fuerzas aditivo implementado en el programa AMBER. Se caracterizó el sitio activo y se determinaron los cambios estructurales al ligar dos o tres átomos de magnesio. La interacción droga proteína se analizó utilizando simulaciones de Docking(Encaje) flexible. Se pudieron determinar las interacciones entre los diferentes bisfosfonatos y la enzima FPPS perteneciente a diferentes especies. Asimismo se sugieren nuevos inhibidores que tendrían acción específica en *Trypanosoma cruzi*.

846. (7141) ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA INTERACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO CON CITOCROMO C' Y SU RELEVANCIA PARA LA GUANILATO CICLASA. CAPECE, LUCIANA; MARTÍ, MARCELO; CRESPO, ALEJANDRO; ESTRIN, DARÍO

DQIAQF-INQUIMAE-FCEN-UBA.

El citocromo c' (cit c') es una hemoproteína de bacteria cuyas propiedades espectroscópicas son similares a las de guanilato ciclasa soluble (sGC). Esta última es el único receptor conocido de óxido nítrico y cataliza la conversión de GTP a GMPcíclico cuando se activa por unión con óxido nítrico. A pesar de que no

se cuenta con información cristalográfica, se cree que la formación del complejo pentacoordinado con NO (5c-NO) asociado a la ruptura del enlace Fe-HIS120 constituye el disparador de un cambio conformacional que lleva a la activación de la enzima y a la transducción de la señal del NO. Existen evidencias experimentales que sugieren que la proteína cit c' de *Alcaligenes xylosoxidans* también forma el complejo 5c-NO. Información cristalográfica reciente indica que en el mismo el NO ocuparía el sitio proximal, lo que se ha propuesto también para explicar el funcionamiento de la sGC. Con el objeto de obtener información microscópica respecto de este fenómeno, se realizaron cálculos híbridos cuántico-clásicos (QM/MM) a nivel DFT utilizando el código SIESTA. El entorno proteico fue modelado utilizando una implementación del campo de fuerzas Amber99. Con el fin de arrojar luz sobre la química de coordinación del NO en el sitio activo de la cit c', se caracterizaron dos estructuras con el NO unido en la cara distal y proximal del grupo hemo. Se observó que la posición distal se ve desestabilizada por la presencia de la LEU16. Por otra parte vimos que la conformación con el NO distal presenta dos mínimos (DE = 7.2 kcal/mol) separados por una barrera de 9.2 kcal/mol, uno de los cuales muestra la HIS120 proximal disociada del Fe, e interactuando fuertemente con un residuo ARG124. Finalmente se calculó la afinidad por oxígeno de la cit c', obteniendo un valor de 8.4 kcal/mol, significativamente más bajo que el correspondiente al grupo hemo aislado, consistentemente con propiedades de la sGC. En resumen, cit c' resulta un buen modelo para entender la interacción de NO con hemoproteínas.

847. (7142) ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN HEMOPROTEÍNAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. BOECHI, LEONARDO; MARTÍ, MARCELO A.; CRESPO, ALEJANDRO A.; ESTRIN, DARÍO A.

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física e INQUIMAE-CONICET, FCEyN, UBA.

Mycobacterium tuberculosis es el agente causante de la tuberculosis humana, una enfermedad que causa, mundialmente, más de un millón de muertes por año. Se ha reportado que posteriormente a la infección parasitaria, los macrófagos circundantes producen óxido nítrico (NO), que actúa inhibiendo el desarrollo de parásitos como el *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium*, y *Toxoplasma*, probablemente debido a la inactivación de serinoproteasas como de otras enzimas. Los efectos tóxicos del NO pueden ser contrarrestados por el microorganismo mediante la oxidación de NO por O₂ coordinado a grupos hemo en diversas hemoproteínas. En este sentido, se ha encontrado que *M. tuberculosis* codifica para pequeñas hemoproteínas, llamadas hemoglobinas truncadas. Existen dos tipos diferentes de hemoglobinas truncadas, conocidas como TrHb-N y TrHb-O. Recientemente se ha mostrado que la TrHb-N estaría involucrada en la detoxificación de NO mediada por oxígeno. Con el objeto de explorar las bases moleculares de la acción de esta proteína, en el presente trabajo se estudiaron los canales de entrada del NO en ésta y en proteínas relacionadas. Utilizando un método novedoso que combina la dinámica molecular con la termodinámica estadística se obtuvieron los perfiles de energía para la entrada del NO a través de los diferentes canales que conectan el exterior de la proteína con el grupo hemo. Los resultados para las barreras energéticas son consistentes con los parámetros cinéticos experimentales obtenidos para la reacción de coordinación del NO a la hemoproteína libre. Además se localizaron sitios de alojamiento secundarios para el NO consistentes con los obtenidos mediante técnicas de rayos-X. Los datos del presente trabajo permiten concluir que la eficiencia de la TrHb-N para detoxificar el NO estarían fundamentalmente asociados con un canal de entrada con una baja barrera energética.

848. (7395) SEÑALES DE CALCIO COLECTIVAS (PUFFS) A PARTIR DE SIMULACIONES DE CANAL ÚNICO. SOLOVEY, GUILLERMO; FRAMAN, DANIEL; PANDO, BERNARDO; PONCE DAWSON, SILVINA

Departamento de Física - FCEN - UBA

Los canales de calcio sensibles a IP₃ están distribuidos espacialmente en forma de clusters. Las señales elementales de calcio (blips) son generadas por canales individuales y cada cluster contiene del orden de 25 canales separados entre sí por una distancia de 10 nm. Señales de calcio más amplias (puffs) se generan por la apertura «sincronizada» de varios canales dentro de un cluster. En este trabajo estudiamos las propiedades estadísticas (distribución de los tiempos medios de apertura y amplitud) de los puffs utilizando una descripción matemática de los canales y del citosol. Utilizamos dos modelos de canal único: uno con apertura calcio dependiente y otro independiente, mostrando cual de los dos modelos sería consistente con los experimentos de Ian Parker et al.

849. (7421) PROCESOS AUTORREGULADOS: APLICACIONES AL MODELADO DE CANALES. FRAIMAN, DANIEL; PONCE DAWSON, SILVINA.

Departamento de Física, F.C.E.y N., U.B.A.

El formalismo estándar para caracterizar el funcionamiento de un canal, a partir de mediciones electrofisiológicas, es el de Procesos de Markov Agregados. Básicamente se plantea un modelo de cadena de Markov y con este formalismo se puede estudiar que «tan bueno» es el modelo propuesto. En este trabajo proponemos un formalismo alternativo, sin utilizar la hipótesis Markoviana, basado en la autorregulación. En particular, mostramos como un modelo de dos estados bajo este nuevo formalismo puede dar lugar a comportamientos muy complejos como actividad de burst y modos de compuerta.

850. (7446) SIMULACIONES MONTE CARLO PARA ANALIZAR LA ESTABILIDAD DEL CLUSTER HIDROFÓBICO Y DEL ESQUELETO PEPTÍDICO DE UNA HORQUILLA β . NICASTRO, ALCIDES (1); SFERCO, SILVANO J. (1,2).

(1)Departamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, (2) INTEC, Güemes 3450, Santa Fe.

La proteína G de *Streptococcus* tiene una horquilla tipo β (β -hairpin) que cuando se la separa del resto de la proteína aún conserva su estructura secundaria intacta (normalmente ocurre lo contrario). El plegamiento de esta horquilla y su estabilidad se adjudican a la formación de enlaces de hidrógeno intracatenarios y de un cluster que agrupa cuatro cadenas laterales hidrofóbicas enfrentadas. No hay acuerdo en la literatura respecto de cuál de estos factores es el dominante, en orden de alcanzar la estructura nativa. En este trabajo se estudió la estabilidad de la β -hairpin en vacío y en solvente acuoso explícito. Se utilizó el método de Monte Carlo junto con el campo de fuerzas AMBER. Se realizaron simulaciones a partir de la β -hairpin nativa y de un sistema mutante, a 300 y 400K. Se monitoreó la energía total del sistema, así como distintos parámetros que permiten estudiar la estabilidad del cluster hidrofóbico y del esqueleto peptídico. Algunas estructuras del último tramo de la simulación fueron optimizadas en su geometría y comparadas con la estructura nativa. Los resultados de las simulaciones en vacío, tanto a 300 como a 400K, muestran que la estructura de horquilla tipo β permanece estable a lo largo de la simulación, mientras que el cluster hidrofóbico varía de acuerdo a la temperatura de la simulación realizada. Los resultados en solvente acuoso explícito (con el esqueleto fijo) muestran que el cluster hidrofóbico se desestabiliza fácilmente. Nuestros resultados sugieren que los enlaces de hidrógeno intracatenarios son más difíciles de romper que el cluster hidrofóbico mismo. Si se supone el proceso de plegamiento como inverso del de desestabilización, puede pensarse que en el primero, la barrera conformacional más importante a superar correspondería a la formación de los enlaces de hidrógeno intracatenarios (desde el quiebre hasta los extremos de la horquilla), mientras que la formación del cluster hidrofóbico ocuparía un lugar complementario en la estabilidad final de la estructura.

851. (7528) CÁLCULO ELECTROSTÁTICO EN EL ESPACIO DE CONFIGURACIONES POSIBLES PARA LA INTERACCIÓN ACYL COA BINDING PROTEIN - MEMBRANA BIOLÓGICA. COSTABEL, MARCELO (1); VALLEJO, DIEGO (2,3); GUÉRIN, DIEGO (1), ERMÁCORA, MARIO(4); GRIGERA, J.RAÚL(2).

(1) Grupo de Biofísica, Dto Física, U.N. del Sur, (2)G. Aplic. Mat. y Est.-Fac.Ing UNLP, (3)Inst.Fís. Líq. y Sist. Biol. UNLP-Conicet,(4) U.N. Quilmes

Existe evidencia experimental que muestra que la proteína Acyl CoA Binding Protein (ACBP) se une a membranas participando en el transporte de ácidos grasos y regulando diferentes funciones celulares. En este marco, disponemos de datos cristalográficos de la variedad de ACBP de la glándula Harderiana de Armadillo resuelta recientemente en nuestro grupo, y modelos computacionales de membranas lipídicas. El presente trabajo continúa la línea ya iniciada de estudio de la interacción eléctrica de ACBP, explorando el paisaje de energía electrostática del complejo ACBP-MEMBRANA LIPÍDICA. En este contexto se utilizó para el cálculo un modelo mixto de Poisson-Boltzmann que representa al solvente como un continuo y las macromoléculas como una cavidad de baja permitividad con cargas puntuales. Diseñamos y desarrollamos una herramienta informática que permite explorar el espacio de energía $dE(\mathbf{r}, \theta, r)$ de este sistema, (donde dE es la energía de ligadura). Se compararon los resultados para el espacio de configuraciones posibles en presencia de diferentes bicapas lipídicas, con y sin carga eléctrica, encontrándose perfiles similares para las curvas dE (config) para los diferentes modelos de membrana. El mínimo a distancias más próximas ($r=2A$) para la interacción de ACBP con una membrana PC:PS 1:1 se encontró para una configuración (180,0) con un $dE = -107$ KJ/mol y un error relativo porcentual del 3%. Finalmente estudiamos la correlación de estos datos con la actividad y el modo en que la ACBP se liga con la membrana, evaluando asimismo la capacidad predictiva de estos medios computacionales. El estudio permite asignar un rol importante a la Energía electrostática en el proceso de interacción ACBP- membrana, encontrándose las configuraciones energéticamente más favorables. Los resultados inducen a postular un mecanismo de interacción adecuado que permita a ACBP ser participe del transporte de ácidos grasos hacia o desde la membrana.

852. (7864) ESTRUCTURA Y DINÁMICA DEL SITIO ACTIVO DE LA ENZIMA METILAMINO DESHIDROGENASA. PALMA, JULIANA; PIERDOMINICI SOTTILE, GUSTAVO; ECHAVE, JULIÁN

Centro de Estudios e Investigaciones Universidad Nacional de Quilmes

La etapa determinante de la velocidad de oxidación de metilamina, catalizada por la enzima metilamino deshidrogenasa (MADH), consiste en la transferencia de un protón desde el grupo metilo del sustrato hacia una de las bases del sitio activo. Mediciones de efecto isotópico cinético sugieren que esta transferencia ocurre por efecto túnel, promovida por las vibraciones de baja frecuencia de la enzima. La estructura cristalina de MADH revela que al menos cuatro de las bases del sitio activo (Asp 32, Asp76, Tyr119 y Thr122) pueden participar en el mecanismo de reacción. Sin embargo se desconoce cuál es el residuo que participa en la etapa determinante de la velocidad. Estudios recientes de mutagénesis sitio-dirigida no lograron hacer esta identificación. En dicho estudio se encontró que las mutaciones introducidas impedían el plegamiento correcto de la enzima. Por otra parte es importante mencionar que además de los cuatro residuos antes mencionados, el sitio activo tiene dos moléculas de agua que pueden actuar en alguna de las etapas del mecanismo. Determinar cuál de las bases del sitio activo es la que realiza la abstracción del protón y cuál es la función de las moléculas de agua presentes. Se realizaron cálculos de estructura electrónica sobre diferentes modelos del sitio activo. Para ello se implementaron di-

ferentes niveles de teoría, desde métodos semiempíricos hasta cálculos con funcionales de la densidad. En todos los casos los cálculos se hicieron con el programa GAUSSIAN 98. Además se hicieron simulaciones de dinámica molecular utilizando el paquete de programas TINKER. Nuestros cálculos indican que de los residuos sugeridos, sólo Asp76 está en condiciones de abstraer el protón. Este proceso tiene una barrera de activación de 7.8 kcal/mol lo que es compatible con una transferencia por efecto túnel. Las aguas del sitio activo forman parte de una red de puentes de hidrógeno que permite mantener una adecuada orientación de Asp76 y del grupo metilo durante la transferencia.

853. (8071) APLICACIÓN DE UN MODELO DE EVOLUCIÓN MOLECULAR CON BASE ESTRUCTURAL (SCPE) A PROTEÍNAS PERTENECIENTES A DISTINTAS CLASES ESTRUCTURALES. PARISI, GUSTAVO; ECHAVE, JULIÁN.

Universidad Nacional de Quilmes, Roque Saenz Peña 180, 1876 Bernal, Argentina

Recientemente y con el objetivo de estudiar como la conservación de la estructura terciaria de una proteína modula la divergencia secuencial, diseñamos un modelo de evolución molecular que considera explícitamente la estructura de la proteína. Este modelo de evolución molecular se denomina structurally constrained protein evolution model o SCPE. Brevemente, el SCPE comienza con la secuencia de una proteína de estructura de referencia a partir de la cual se obtienen variantes secuenciales por mutación al azar. Para cada paso mutacional se calcula un score que estima el grado de perturbación introducida por la mutación. El score es una función que depende de la energía de la secuencia «trial» y de la secuencia anteriormente aceptada. Si el score se encuentra por debajo de un determinado cutoff, la mutación se acepta y la secuencia «trial» se convierte en una secuencia aceptada. A partir de esta secuencia aceptada se continúa iterativamente el proceso mutacional. Con anterioridad, el SCPE fue aplicado exitosamente a una familia estructural que presenta el plegamiento left-handed parallel beta helix. En el presente trabajo tenemos como objetivo demostrar la aplicabilidad del SCPE a otras familias estructurales. Para esto emplearemos métodos de máxima verosimilitud para demostrar que el SCPE puede reproducir los patrones secuenciales encontrados en una determina familia estructural. Según los resultados encontrados en las distintas familias estructurales pertenecientes a distintas clases de plegamientos (alfa, beta, alfa/beta, alfa+beta) encontramos que el SCPE tiene una aplicabilidad general independiente del tipo de plegamiento. Por otro lado demostramos que el SCPE supera en esta evaluación a otros modelos de evolución generalmente usados en la estimación filogenética de proteínas. Finalmente, nuestros resultados además confirman cómo la estructura terciaria de una proteína modula la divergencia y el patrón secuencial encontrado en una determinada familia estructural.

854. (8088) ESTRUCTURA CUATERNARIA Y SIMULACIÓN DE LA EVOLUCIÓN MOLECULAR PROTEICA. FORNASARI, MARÍA SILVINA; PARISI, GUSTAVO; ECHAVE, JULIÁN

Universidad Nacional de Quilmes, Roque Saenz Peña 180, 1876 Bernal, Argentina

Una forma de estudiar la evolución de proteínas es usar modelos que simulen cómo una posición en una proteína puede cambiar de un aminoácido a otro. Muchos de estos modelos utilizan parámetros que son comunes a distintas proteínas sin importar el tipo de plegamiento o el entorno fisicoquímico de la posición considerada. Un gran avance fue la incorporación en estos modelos de información estructural. Entre estos modelos se encuentra el SCPE (structurally constrained protein model) que demostró su eficacia en el estudio de distintos tipos de estructuras terciarias. En este trabajo nos proponemos averiguar si la inclusión de la estructura cuaternaria para la predicción de los patrones secuenciales en una determinada posición mejora el rendimiento

del SCPE. Para este propósito estudiamos un sistema modelo, la proteína UDP-N-acetilglucosamina cuya forma nativa es un homotrímero. En esta proteína estudiamos los patrones de conservación de las posiciones involucradas en interacciones oligoméricas. Para esto utilizamos distintos métodos para evaluar los contactos cuaternarios, exposición al solvente, distribución de aminoácidos por posición y su patrón de conservación relativo. Posteriormente adaptamos el modelo SCPE para que incluya la información de la estructura cuaternaria en la simulación de una determinada proteína de referencia. El análisis de los resultados muestra que el grado de conservación de las posiciones de contacto oligoméricas no es uniforme. Sin embargo, la inclusión de la estructura cuaternaria en el SCPE, mejoró notablemente la predicción del patrón secuencial de las posiciones que intervienen en los contactos proteína-proteína. De esta forma estas posiciones mejoraron el rendimiento global del modelo al comparar los resultados con los datos obtenidos considerando únicamente la estructura terciaria de la proteína considerada. Esto refleja que la estructura cuaternaria, como la terciaria, imponen restricciones secuenciales para la conservación de la estructura nativa.

855. (8089) CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A LA ENFERMEDAD DE PARKINSON DJ-1 COMO CONSECUENCIA DE LA MUTACIÓN L166P. TURJANSKI, ADRIAN; ROITBERG, ADRIAN; COSO, OMAR.

Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular e INFIBYNE - CONICET, FCEyN, UBA. Quantum Theory Project and Department of Chemistry, University of Florida, Gainesville, USA.

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo que afecta a millones de personas de diverso origen étnico y etario. La enfermedad se origina por la muerte de neuronas específicas de la substantia nigra que tienen una respuesta inmune ineficiente contra el stress oxidativo. Se ha encontrado una mayor predisposición a contraer EP en pacientes con mutaciones en genes específicos, en particular tanto en la delección como en una mutación puntual del gen PARK7 que codifica para la proteína DJ-1. El gen de DJ-1 codifica para una proteína de 189 aminoácidos. Recientemente se ha asociado a la mutación que reemplaza una leucina conservada en la posición 166 por una prolina (L166P) con casos de EP familiar. La función de la proteína DJ-1 no ha sido determinada aún, pero se ha propuesto un rol en la respuesta al stress oxidativo; en particular, a través del residuo cisteína ubicado en la posición 106. La estructura de DJ-1 ha sido recientemente resuelta por rayos X y consiste de un homodímero con una alta superficie de contacto entre subunidades. En este trabajo hemos analizado mediante simulaciones computacionales los cambios estructurales que ocurren en DJ-1 al mutarse la leucina 166 y los posibles efectos sobre su función. Realizamos simulaciones de dinámica molecular clásica utilizando el campo de fuerzas aditivo implementado en el programa AMBER. Estudiamos tanto a la proteína nativa como a la mutante en sus formas monomérica y dimerica. Observamos que la mutación L166P evita la formación del dímero desestabilizando la hélice alfa del carboxilo terminal, alterando de esta manera las funciones de DJ-1 comparando con el dímero salvaje. Asimismo detectamos un cambio importante en la conformación de la cisteína 106 que afectaría en forma significativa la capacidad antioxidante de la proteína. Nuestros resultados proveen evidencias que permiten explicar porque tanto pacientes que sufren esta mutación como pacientes que carecen del gen completo muestran fenotipos de EP similares.

CARDIOVASCULAR, RESPIRATORIO Y RENAL 7

856. (6615) ANÁLISIS NO LINEAL DE LA VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDÍACA EN RELACION AL CAMBIO DE DECÚBITO EN PACIENTES CON ENFERMEDAD

CORONARIA. VIGO, DANIEL E.; CARDINALI, DANIEL P.; NICOLA SIRI, LEONARDO; BERBARA, CARLOS; SAMPÓ, EDUARDO; PÉREZ DE LA HOZ, RICARDO; ORTIZ FRÁGOLA, ALBERTO; GUINJOAN, SALVADOR

Laboratorio de Neurociencias, Depto. de Fisiología, UBA, Facultad de Bioingeniería, UNER, Depto. Salud Mental y UCO, Hospital de Clínicas, UBA.

Los indicadores lineales y no lineales de Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca (VFC) permiten analizar la regulación autonómica del ritmo sinusal y son potentes predictores de mortalidad por enfermedad coronaria. En particular, se observó que un aumento en el componente de baja frecuencia de la VFC en relación al cambio de decúbito se asocia a mayor mortalidad. Con respecto a los indicadores no lineales, la correlación fractal (CoFr) aumenta, mientras que la entropía (ApEn) se mantiene estable con el cambio de decúbito en individuos normales. Sin embargo, no se han realizado estudios en pacientes con enfermedad coronaria. Objetivo: Evaluar si la presencia de enfermedad coronaria altera las modificaciones que se observan en los indicadores no lineales de VFC en relación al cambio de decúbito. Material y Método: Se analizaron 12 pacientes con enfermedad coronaria (Enf. Cor) y 14 controles sin enfermedad cardiovascular (Controles). Se registró la duración del intervalo RR durante 10 minutos, calculándose indicadores lineales y no lineales de VFC, en reposo y bipedestación. Se compararon diferencias utilizando ANOVA factorial de medidas repetidas. Resultados: CoFr (media \pm DS): Enf. Cor reposo: 1.07 ± 0.28 ; bipedestación: 1.18 ± 0.30 ; $p = 0.227$. Controles reposo: 1.20 ± 0.22 ; bipedestación: 1.37 ± 0.23 ; $p = 0.045$. ApEn (media \pm DS): Enf. Cor reposo: 1.08 ± 0.12 ; bipedestación: 1.01 ± 0.16 ; $p = 0.276$. Controles reposo: 1.03 ± 0.20 ; bipedestación: 0.94 ± 0.17 ; $p = 0.075$. Conclusión: A diferencia de los individuos control, los pacientes con enfermedad coronaria no presentan cambios en la correlación fractal relacionados con el cambio de decúbito. Este hecho refleja alteraciones en los componentes no lineales de la regulación autonómica del ritmo sinusal en este grupo de pacientes.

857. (6824) AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO COMO POTENCIAL FUENTE DE IMPLANTE EN INFARTO MIOCÁRDICO. PEREZ MILLAN, M.INES; LORENTI, ALICIA; BROZZI, NICOLAS; BRACCO, DANIEL; ARGIBAY, PABLO.

ICBME, Cirugía Cardiovascular Hospital Italiano de Buenos Aires

La cardiomioplastia celular consiste en el implante de células in situ con el fin de inducir el crecimiento de nuevas fibras musculares cardíacas, y el desarrollo de angiogénesis en el miocardio lesionado. El miocardio adulto infartado es incapaz de reparar en forma efectiva su lesión, debido a la normal quiescencia de las células maduras, y a la escasez de células progenitoras. Objetivo: aislar, identificar y cultivar células satélite de músculo esquelético adulto, con modulación y regulación de las condiciones de diferenciación, para posteriores experiencias de implante autólogo en un modelo animal de infarto miocárdico. Materiales y métodos: se extrajeron muestras de músculo intercostal de conejos para aislar células mioblásticas. Estas fueron cultivadas en medio DMEM 70%-HAM'S F-12 30%, suplementado con factores de crecimiento y 20% de suero equino. Después de lograr la suficiente amplificación de las células, el porcentaje de suero equino fue reducido al 2% para inducir la diferenciación celular. Resultados: De las células cultivadas, un 40% fueron musculares esqueléticas que se identificaron mediante inmunohistoquímica con anticuerpo anti desmina. Luego de un mes de cultivo, las mismas presentaron morfología característica de células musculares, observables por su capacidad de contracción. Se concluye que a partir de músculo esquelético se pueden aislar, cultivar y diferenciar células satélite. Al realizar el implante autólogo de estas células satélite en el miocardio infartado se podrían evitar reacciones inmunes en el animal receptor.

858. (7019) MODIFICACIÓN DE LA SÍNTESIS DE L-CITRULINA EN ATEROGÉNESIS EXPERIMENTAL POR HIPERFIBRINOGENEMIAS INDUCIDAS. MOYA, MONICA; CAMPANA, VILMA; SIMES, JUAN CARLOS; TÁRAN, MARIANA; DANIEL, PICCINI; PALMA, JOSE ATILIO

Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. UNCórdoba

En trabajos epidemiológicos previos se ha determinado relación entre concentraciones elevadas de fibrinógeno y enfermedad aterosclerótica, pero el mecanismo por el cual fibrinógeno estaría involucrado es aún desconocido. La aterogénesis generada por hiperfibrinogenemia inducida por estímulos proinflamatorios, podría afectar la vía de síntesis y acción de L-citrulina. En este trabajo se estudió el comportamiento del co-sustrato de óxido nítrico (ON): L-citrulina y de fibrinógeno plasmático, en ratas con lesiones anatomopatológicas compatibles con aterogénesis. La inducción proinflamatoria se realizó por inyección parenteral diaria de histamina (0,125 mg/rata) y adrenalina (0,1 mg/rata) en un período de 120 días (IM x 120 ds). Se determinó en plasma fibrinógeno (mg/dL) y L-citrulina (mM) por espectrofotometría y la anatomía patológica de aorta torácica (AP) por microscopía óptica en los lotes control (I) e IM x 120 ds. (II). En el grupo (II) se observó un aumento significativo de FP ($486,27 \pm 12,64$) con respecto al control (no injuriado) (I) ($206,89 \pm 4,43$) ($p < 0,001$). Similar comportamiento se observó en la síntesis de L-citrulina, que aumento su concentración significativamente en el grupo (II) ($5,19 \pm 0,12$) en comparación con el control (I) ($3,76 \pm 0,15$) ($p < 0,001$). En AP del grupo (II) se observaron lesiones en el 90 % de los cortes estudiados respecto al control ($p < 0,001$), describiéndose denudación endotelial, engrosamiento intimal, aumento de la matriz extracelular y presencia de foam cells. Estos resultados permiten postular que el mecanismo que utilizaría la hiperfibrinogenemia para generar lesiones aterogénicas, sería a través de la modificación de la síntesis de ON y del co-sustrato: L-citrulina, que activaría la vía fisiopatológica con formación de peroxinitrito y la subsiguiente nitración de proteínas con daño tisular, generando peroxidación lipídica (foam cells) y alteración de la respuesta vasodilatadora.

859. (7037) FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EVALUADOS EN UNA ZONA ENDEMICIA. BURRONE, S(1); SALOMONE, O(2); BASQUIERA, A(2); SEMBAJ, A(3); AGUERRI, A(3); MADOERY, R(2); ENDERS, J(1); FERNÁNDEZ, R(1)

(1)Lab. Chagas-Física biomédica, (2)Hospital Privado, (3)Química Biológica.

En las enfermedades cardiovasculares se estudian los factores de riesgo individuales y los sociales, siendo también la enfermedad de Chagas una problemática que abarca aspectos socioculturales y económicos. La incidencia de la hipertensión, diabetes, obesidad, sedentarismo, el alcoholismo y el estrés están relacionados con las características sociodemográficas de la población. En los países más pobres, las deficientes medidas higiénico-sanitarias y alimentarias conllevan a una mayor prevalencia de enfermedades infecciosas y nutricionales. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la asociación de los factores de riesgo individuales y colectivos con las características clínicas y electrocardiográficas de pacientes con enfermedad de Chagas. Se estudio una población de 80 habitantes de un área de alta endemicidad, durante 2 años. En todos los pacientes se realizaron las pruebas serológicas, PCR, ECG y ecocardiograma. Las variables asociadas fueron edad, sexo, índice de masa corporal, antecedentes familiares de enfermedad de Chagas, antecedentes familiares de cardiopatía isquémica, dislipemia, diabetes, hipertensión, tabaco, presencia de síntomas cardiovasculares y digestivos. Los datos fueron analizados por categórico y ANOVA. El 59% de los pacientes tuvieron serología positiva. Al menos el 71% presentó un factor de riesgo asociado a la cardiopatía chagásica, y el 50% más de dos factores. Cuando se realizó el análisis estadístico de los factores de riesgo se observó que to-

dos ellos están igualmente asociados a la presencia de síntomas cardiovasculares y alteraciones electrocardiográficas, expresándose una precoz sintomatología cardiovascular en los pacientes que expresaron más de 4 factores de riesgo ($p < 0,01$). Se puede concluir que los pacientes con cardiopatía chagásica presentan cardiopatía de base sumándose los factores de riesgo individuales y sociales, esto incrementaría la probabilidad de mortalidad cardiovascular.

860. (7067) INTERRELACION ENTRE EL METABOLISMO OXIDATIVO Y NITROSATIVO MITOCONDRIAL EN ENDOTOXEMIA. ALVAREZ, SILVIA; PEREZ, MARIANA; BOVERIS, ALBERTO.

Lab. de Radicales Libres en Biología-CONICET, Físicoquímica, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA

La endotoxemia constituye un paradigma de inflamación generalizada, con aumentos masivos de NO y citoquinas en fluidos biológicos, con daño sistémico al endotelio vascular y con respiración tisular inadecuada aunque la entrada de oxígeno no es limitante. Las mitocondrias de corazón y diafragma producen 0.69 y 0.77 nmol NO/min. mg proteína; velocidades que corresponden a un 45 y 24% de la máxima producción de NO a nivel celular, respectivamente. El shock séptico y la endotoxemia tiene su origen en una exacerbada respuesta inflamatoria, que lleva al daño mitocondrial. El músculo esquelético es uno de los órganos blanco en endotoxemia, mostrando un aumento en la producción de NO y un estrés oxidativo temprano. Se determinaron las propiedades cinéticas de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) de corazón y diafragma. Para diafragma, los valores de $K[M]$ para $O[2]$ y L-arg fueron 4.6 y 37 mM, y para corazón fueron 3.3 y 36 mM. El pH óptimo para estudiar la actividad de mtNOS fue 6.5 para diafragma, y 7.0 para corazón. Un marcado aumento en la actividad de mtNOS se observó en ratas endotoxémicas (10 mg LPS/kg peso, 6 h de tratamiento), 90% en diafragma y 30% en corazón. La producción mitocondrial de $O[2]$ (-) y $H[2]O[2]$ aumentó 2-3 veces con respecto a valores control, en ratas endotoxémicas. La actividad de Mn-SOD mostró un aumento al doble en animales tratados, mientras que la actividad de catalasa no mostró variación significativa. Una de las hipótesis que permite explicar los mecanismos moleculares involucrados en la compleja condición endotoxémica es que la aumentada producción de NO por la mtNOS, lleva a una excesiva producción de peroxinitrito y nitración de proteínas en la matriz mitocondrial, causando disfunción mitocondrial y deficiencia contráctil.

861. (7214) ACCION DE LA MELATONINA SOBRE EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EN LA RATA. CENTRELLA, JOSÉ MAURO; CARDINALI, DANIEL; LAGUENS, RUBEN.

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, Departamento de Patología, Universidad Favaloro, Buenos Aires.

Antecedentes: Numerosos estudios demuestran que la melatonina, en dosis farmacológicas, reduce el daño cardíaco en modelos experimentales de isquemia/reperfusión. Recientemente, se ha confirmado que la remoción quirúrgica de la glándula pineal (fuente natural de la hormona), es suficiente para agravar este tipo de lesiones. Objetivo: Cuantificar el efecto citoprotector de la melatonina en el infarto de miocardio agudo. Método: El estudio fue realizado a doble ciego. En ratas hembras de cepa Wistar, de 200-300 g de peso, se realizó la ligadura quirúrgica de la arteria coronaria izquierda a 1 mm de su origen. Los animales se dividieron en dos grupos: 1- infarto + melatonina (100 mg/ml) administrada en agua de bebida, 48 h antes de la cirugía y durante todo el protocolo (n=12), 2- infarto + vehículo (n=8). Los animales se sacrificaron 15 días después de la ligadura y los corazones se procesaron para su estudio histológico. Resultados: La cuantificación mediante microscopía de luz y análisis de imágenes del tamaño del infarto indicó una reducción altamente significativa en los animales tratados con melatonina,

(16.11%±4.29 SD de la masa ventricular izquierda), en comparación con los controles (36.37%±8.57 SD), $p < 0.001$ (Prueba «t» de student). Estos resultados indican un efecto citoprotector significativo de la melatonina en el infarto de miocardio agudo en ratas.

862. (7250) EL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO REDUCE EL TAMAÑO DE INFARTO ACTIVANDO LOS RECEPTORES A1 Y LOS CANALES DE K+ATP. D'ANNUNZIO, VERÓNICA; DONATO, MARTÍN; SABÁN, MELINA; GELPI, RICARDO J.

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El poscondicionamiento isquémico (Poscon) reduce el área de infarto en animales normales (N) y ha sido sugerido que el óxido nítrico (ON) participa en su mecanismo. Por otro lado, la hipercolesterolemia inhibe la síntesis de ON e induce disfunción endotelial. El objetivo fue determinar si el Poscon reduce el área de infarto en animales hipercolesterolémicos (H) con disfunción endotelial y si los receptores A1 y los canales de K+ATP participan en el mecanismo del Poscon. Corazones aislados de conejos N fueron perfundidos con flujo constante según técnica de Langendorff y sometidos a 30 min de isquemia (I) y 30 min de reperfusión (R) (Con-N). En un segundo grupo se realizó un protocolo de Poscon consistente en 2 ciclos de R/I de 30 seg cada uno realizados luego de 30 min de I (Poscon-N). En otro grupo se repitió Poscon-N, pero durante los 2 ciclos de R/I se administró DPCPX (bloqueante de los receptores A1, DPCPX-N). Finalmente, se repitió Poscon-N pero durante los 2 ciclos de R/I se administró glibenclamida (bloqueante de los canales de K+ATP, Glib-N). Todos los protocolos se repitieron en animales H: Con-H, Poscon-H, DPCPX-H y Glib-H. Se determinó el área de infarto utilizando TTC, la concentración plasmática de colesterol y los cambios en la presión de perfusión coronaria (PPC) en respuesta a un bolo de acetilcolina (40 µg/kg) a fin de evaluar disfunción endotelial. *: $p < 0.05$ vs Con-N, #: $p < 0.05$ vs Con-H. X±ES. La concentración de colesterol en animales N e H fue de 47.3±9.3 y 340.1±128.8 mg/dl, respectivamente. La acetilcolina no modificó la PPC en los N pero la incrementó un 31.2±8.2% en los H.

Con-N (n=9)	Poscon-N (n=8)	DPCPX-N (n=11)	Glib-N (n=5)	Con-H (n=7)	Poscon-H (n=6)	DPCPX-H (n=6)	Glib-H (n=5)
Infarto 16.7±1.6	4.9±1.2*	14.4±3.1	14.2±2.6	31.9±3.1*	5.5±1.5#	22.9±3.5	14.8±2#
(%)							

El Poscon reduce el área de infarto en animales N e H, a través de los receptores A1 y los canales de K+ATP. La protección hallada en los animales H sugiere un mecanismo independiente del ON.

863. (7368) REDUCCIÓN DEL TAMAÑO DE INFARTO DE MIOCARDIO POR TRANSFECCIÓN CON EL GEN DE VEGF165 EN OVEJAS CON LIGADURA DE LA ARTERIA CORONARIA DESCENDENTE ANTERIOR. OLEA, DANIELA; VERA JANAVEL, GUSTAVO; CABEZA MECKERT, PATRICIA (1,2); DE LORENZI, ANDREA (1); MELE, ANIBAL (1); CUNIBERTI, LUIS; BERCOVICH, ANDRÉS (3); CROTTIGINI, ALBERTO; LAGUENS, RUBÉN (1)

Universidad Favaloro, Fundación Favaloro (1), CIC Buenos Aires (2), Bio Sidus (3).

En la enfermedad coronaria la reducción del tamaño de infarto es un objetivo clave, ya que la extensión de la necrosis se relaciona directamente con la magnitud del remodelamiento del ventrículo izquierdo (VI) que lleva a la insuficiencia cardíaca. Dado que el VEGF (además de inducir angiogénesis) ha demostrado tener un efecto mitogénico sobre miocardiocitos adultos en modelos de isquemia e infarto de miocardio, investigamos si la transfección con un plásmido codificante para VEGF165 (pVEGF) reduce el tamaño de infarto a 60 días de su producción. En 16 ovejas se ligó la arteria descendente anterior y se inyectó en el

miocardio 3,8 mg de pVEGF (n=8, grupo tratado) o de plásmido vacío (n=8, grupo placebo). Se evaluó ecográficamente la función del VI en reposo y stress (dobutamina) a los 3 y 60 días post-infarto. El tamaño de infarto se evaluó por un método combinado de cuantificación de extensión endocárdica y epicárdica en el corazón entero y en cortes histológicos teñidos con rojo sirio, y se expresó como porcentaje del área total del VI. El tamaño de infarto fue $23,6 \pm 1,9\%$ (media \pm DS) en el grupo tratado y $32,7 \pm 2,7\%$ en el placebo ($p < 0,02$). La fracción de acortamiento en el borde del infarto aumentó significativamente en el grupo tratado (de $19,2 \pm 2,6\%$ a $31,6 \pm 3,6\%$, $p < 0,01$) y no en el placebo (de $22 \pm 2,3\%$ a $25,5 \pm 4,4\%$, $p = \text{NS}$). El engrosamiento de pared anterior del VI aumentó significativamente en el grupo tratado (de $9,9 \pm 3\%$ a $24,8 \pm 8,1\%$, $p < 0,05$) y no en el placebo (de $9,6 \pm 6,2$ a $11,4 \pm 7,4$ $p = \text{NS}$). El índice de motilidad parietal de stress fue menor en el grupo tratado ($2,3 \pm 0,3$) que en el placebo (3 ± 0 ; $p < 0,05$), indicando mayor tolerancia al stress en el grupo tratado. En ovejas con ligadura coronaria aguda, la transfección con pVEGF165 disminuye el tamaño de infarto y mejora la función de reposo y stress del VI a 60 días de la oclusión.

864. (7515) CORRELACIÓN ENTRE DAÑO CARDÍACO POR DEFICIENCIA DE COLINA Y ESTRÉS OXIDATIVO. REPETTO, MARISA; FIORI, MARIANA (1); OSSANI, GEORGINA (1); LAGO, NÉSTOR (1); MONSERRAT, ALBERTO (1); BOVERIS, ALBERTO

Química Orgánica, FFYB, Patología Experimental, FMED, UBA.

La deficiencia de colina (DC) en ratas recién destetadas produce alteraciones a nivel de riñón, corazón, hígado, ojos y SNC. El estrés oxidativo (EO) como mecanismo patogénico de diversas enfermedades constituye un tema de candente interés. Se estudió la correlación entre daño cardíaco por DC y EO. Ratas Wistar recién destetadas (21 días) fueron divididas en dos grupos, uno de ellos alimentado con dieta DC y el otro con dieta suplementada como control. Los animales fueron sacrificados a los 3, 5, 6 o 7 días previa obtención de sangre para dosaje de CPK, LDH, GPT, GOT, urea y creatinina. El corazón fue seccionado sagitalmente. Una de sus mitades fue destinada a estudio anatomopatológico y la otra a estudio de EO. Lo primero se realizó mediante la inclusión del material en parafina y coloración con diversas técnicas histológicas. Lo segundo se efectuó midiendo malonaldehído, producto de las reacciones mediadas por radicales libres, generados por la peroxidación de lípidos, por la técnica de TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) y quimioluminiscencia iniciada por hidroperóxido de terbutilo como determinación del nivel integrado de antioxidantes liposolubles. El estudio histológico del material mostró, en ratas experimentales sacrificadas al séptimo día, muerte celular incluyendo necrosis de coagulación junto con hemorragia e infiltrado inflamatorio polimorfonuclear. La CPK mostró un aumento progresivo en las ratas experimentales, siendo el análisis estadístico significativo. Los niveles de malonaldehído fueron superiores en el grupo experimental, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a partir del tercer día mientras que la quimioluminiscencia, también aumentada en el grupo experimental, a partir del quinto día. La aparición de EO precede al daño morfológico cardíaco implicando que podría tratarse de uno de los mecanismos patogénicos involucrados.

CARDIOVASCULAR, RESPIRATORIO Y RENAL 8

865. (6725) UN ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS PROARRÍTMICOS DE LA GLIBENCLAMIDA EN MIOCARDIOS NORMALES Y DIABÉTICOS. DEL VALLE, HÉCTOR FABIÁN; NEGRONI, JORGE ANTONIO; LASCANO, ELENA CATALINA

Universidad Favaloro

Introducción: La mayor parte de los estudios experimentales respecto de las acciones cardiovasculares de las sulfonilureas se han realizado en corazones sanos y prácticamente no existen estudios en corazones diabéticos. **Objetivo:** analizar los efectos de diferentes dosis de glibenclamida (G) en el desencadenamiento de arritmias en el miocardio normal (N) y diabético (D). **Métodos:** La diabetes se indujo con aloxán (1 gr). Se usaron 36 ovinos instrumentados con un oclusor coronario, un transductor de presión ventricular y un par de cables para registro electrográfico. Grupos experimentales: a) control (CN y CD), 12 min de isquemia (I) y 2 hs de reperfusión (R); b) igual a a) pero con G 0.1 mg/Kg (NG 0.1 y DG 0.1); c) igual a b) pero con G 0.4 mg/Kg (NG 0.4 y DG 0.4). Las arritmias se analizaron con un índice de severidad (IS). **Resultados (M \pm ES):** La infusión de G resultó en un mayor número de arritmias tanto en los animales N (NG0.1= $7.5 \pm 0.7\uparrow$ y NG0.4= $12 \pm 0.8\uparrow$, $\uparrow p < 0.01$ vs CN= 4.8 ± 0.5) como en los D (DG0.1= 12 ± 0.9 y DG0.4= 13 ± 0.7 , $p < 0.01$ vs CD= 2 ± 0.4), pero el efecto proarrítmico en dosis bajas fue mucho más notorio en los últimos (DG 0.1 vs NG 0.1, $p < 0.05$). Por otra parte en el miocardio N parece existir una dosis dependencia en el efecto arritmógeno (NG 0.1 vs NG 0.4, $p < 0.05$) que no se evidencia en el miocardio D. a) La infusión de G determinó un mayor grado de aparición de arritmias tanto en ovinos N como D; b) el miocardio D es más sensible a los efectos de la droga a bajas dosis y c) en el miocardio N la acción arritmigénica es dosis dependiente. **Relevancia Clínica:** la mayor sensibilidad del miocardio diabético a la acción de la glibenclamida podría explicar la elevada morbimortalidad cardiovascular en pacientes diabéticos con patología coronaria agregada. La alteración funcional de los canales de K ATP dependientes sarcolemales demostrada en animales y pacientes diabéticos podría constituir la base fisiopatológica de los resultados encontrados en este estudio.

866. (6729) EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON INSULINA PROTEGE AL MIOCARDIO DIABÉTICO CONTRA EL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN. DEL VALLE, HÉCTOR FABIÁN; LASCANO, ELENA CATALINA; NEGRONI, JORGE ANTONIO

Universidad Favaloro

Introducción: la insulina (In) tiene una acción trófica sobre algunos canales iónicos y en consecuencia, su déficit en la diabetes tipo I podría constituir la base fisiopatológica de la alteración de la duración del potencial de acción (DPA) y del mayor daño por isquemia y reperfusión (I/R) [la modificación de la DPA en I altera el movimiento del calcio afectando la función contráctil]. **Objetivo:** evaluar los efectos del tratamiento crónico con In sobre la DPA y sobre la respuesta contráctil del miocardio diabético (D) en I/R. **Métodos:** se instrumentaron 12 ovinos diabéticos (aloxán 1gr) con un sensor de presión ventricular, un oclusor coronario y cristales para medir espesor parietal. Grupos: a) control (DC), 12 min I y 2 hs R; b) igual que a) pero luego de 15 días de tratamiento con In (DIn). La recuperación mecánica en la R se evaluó con la fracción de espesamiento parietal (expresada en % respecto del valor basal considerado 100%). La DPA se midió al 90% de repolarización (electrodo de succión epicárdico). **Resultados (M \pm ES):** el tratamiento crónico con In modifica la DPA en la R temprana (DC= 329 ± 10 ms vs DIn= 271 ± 8 ms, $p < 0.01$) y durante la I (DC= 135 ± 6 ms vs DIn= 170 ± 5 ms, $p < 0.05$) y mejora la recuperación contráctil postisquémica (DC= 64 ± 8 vs DIn= 40 ± 4 , $p < 0.01$). El tratamiento crónico con insulina modifica la DPA y mejora la recuperación contráctil del miocardio D en situación de I/R. **Relevancia Clínica:** la alteración en la DPA existe en pacientes diabéticos y se considera la base fisiopatológica de la prolongación del QT, de la heterogeneidad en la repolarización ventricular y de la predisposición a arritmias graves. Asimismo cambios en la DPA alteran el nivel de calcio intracelular afectando la recuperación contráctil. La acción trófica de la In sobre diferentes canales iónicos explica los resultados observados y aporta una justificación fisiopatológica al empleo de la misma en pacientes diabéticos no sólo como reguladora de la glucemia sino también como terapia de cardioprotección.

867. (7264) INFLUENCIA DE LA MELATONINA SOBRE LAS ARRITMIAS DE REPERFUSIÓN EN CORAZONES AISLADOS DE RATA. PONCE ZUMINO, AMIRA; MIATELLO, ROBERTO; RISLER, NORMA; CRUZADO, MONTSERRAT; MOLINA, HÉCTOR; PRADOS, LAURA; CARRIÓN, ADRIANA; VERDAGUER, MARÍA NIEVES

UNCuyo, FCM, Dpto.Morfofisiología, Área de Fisiología, Patología. FCM, UNCuyo, Mendoza

Las arritmias de reperfusión (AR) son atribuidas a sobrecarga de calcio, a la cual contribuye, en el momento de la reoxigenación, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Recientemente, se ha puesto en evidencia una acción barredora y antioxidante de la melatonina. Para comprobar su efecto sobre las AR en corazones aislados de ratas, se realizaron 3 series de experimentos (n=10 cada uno): Control (C), perfundidos con solución de Krebs-Henseleit más 0.5 ml/L de etanol; MEL 10, ídem C más melatonina 10 µM y MEL 20, ídem C más melatonina 20 µM, disueltos en 0.5 ml de etanol. Se produjo isquemia regional (10 min) por oclusión de la coronaria anterior y reperfusión (R) por reapertura de la misma (20min). Se registraron los potenciales de acción y el electrograma, se midió amplitud, potencial de reposo y duración. Se determinó la frecuencia cardíaca y la presencia o no de AR, tipo y duración. Con la técnica de Capodónico y Lissi se midió el poder antioxidante total (PAT) en trozos de ventrículo derecho (VD) e izquierdo (VI). Los valores de las variables electrofisiológicas, analizados con ANOVA y posttest de Newman Keuls, no presentaron diferencias. Las determinaciones del PAT, en cambio, mostraron que MEL 10 y MEL 20 tienen mayor poder antioxidante que C (p< 0.001), sin diferencias entre MEL 10 y MEL 20, ni entre VD y VI en ningún grupo. La incidencia de las AR sostenidas disminuyó de 70% en C a 30% en MEL 10 y 10% en MEL 20. El 30% de los corazones en los 3 grupos desarrolló arritmias, pero recuperó el ritmo sinusal antes de los 15 min de R. El 40% de los casos en MEL 10 y el 60% en MEL 20 no presentaron AR. Estos porcentajes se evaluaron con el test del Chi cuadrado que dio una p=0.0432. Se puede concluir que el efecto cardioprotector de la melatonina sobre las AR no se debería a modificaciones en alguna de las variables electrofisiológicas, sino que estaría asociado a su poder antioxidante y barredor de ROS.

868. (7546) PREVENCIÓN POR ATORVASTATINA DE LA HIPERTROFIA GLOMERULAR INDUCIDA POR LA DIETA ALTA EN SODIO EN RATAS. FIORE, MARIA CECILIA; BAIGORRIA, SANDRA T; GARCIA, NESTOR H; JUNCOS, LUIS I.

IPEM

Ha sido demostrado que la dieta alta en sodio, en ausencia de hipertensión en ratas WKY puede inducir cambios miocárdicos indistinguibles de los observados en la rata sal sensible luego de una dieta alta en sodio. Pero los efectos a nivel renal no han sido evaluados todavía. Por otro lado, las estatinas han demostrado reducir la proteinuria mediante sus propiedades antiinflamatorias y antifibróticas, independientes de la reducción de la colesterolemia. Por ello, hipotetizamos que la dieta alta en sodio induce hiperfiltración e hipertrofia glomerular en ausencia de hipertensión en ratas normotensas, y este mecanismo puede ser revertido mediante el uso de la atorvastatina. Materiales y Métodos: Ratas Wistar fueron estudiadas durante 45 días, dividiéndolas en los siguientes grupos: a.Dieta alta en sodio (4% ClNa) (DANA), b.DANA+Atorvastatina (50 mg/kg.día), b.Atorv y c.Control (dieta estándar). Se evaluó la TA, proteinuria de 24 hs, balance de sodio, filtrado glomerular y la masa ventricular izquierda (MVI). La determinación del volumen glomerular (VG) se realizó por medio del aislamiento por tamización de los glomérulos y las fotos fueron analizadas. Resultados: La DANA aumentó la proteinuria de 4.40±1.5 a 20.87±2.32 mg/24hs vs. el Control 4.79±2.03 mg/24hs, p<0.05 sin observarse cambios en la TA, este aumento en la proteinuria pudo ser prevenido por atorvastatina (DANA+Atorv 8.62±4.37 mg/24hs, p<0.05). El VG al día 45 fue en el Control de 3.33*10(6)±0.26 µm³ pero la DANA lo incrementó significativamente

a 4.40*10(6)±0.58 µm³ (p<0.05), y esto se previno por Atorv (DANA+Atorv 3.64*10(6) ±0.47 µm³) (p<0.05 vs DANA). La dieta alta en sodio aumenta el volumen glomerular y consecuentemente se produce un aumento en el filtrado de proteínas sin hipertensión ni sobrepeso. Atorvastatina previno el desarrollo de hiperfiltración e hipertrofia glomerular inducido por la DANA. Estos datos sugieren un efecto nefroprotector de atorvastatina independiente del colesterol e hipertensión.

869. (7606) EFECTOS CARDIOVASCULARES DEL VINO MALBEC EN UN MODELO DE SÍNDROME X. RENNA, N; GONZALEZ, S; RISLER, N; CRUZADO, M; PONCE, A; MIATELLO, R.

Depto. Patología, F.C.M., U.N.Cuyo, IMBECU-CONICET

Se examinó el efecto de la administración crónica de vino Malbec desalcoholizado (V) sobre las alteraciones metabólicas y estructurales asociadas al síndrome de insulinoresistencia en ratas (FFR). Ratas Wistar macho (30 días) se separaron en 4 grupos (n=8 en todos) y trataron durante un período de 8 semanas: 1-Control; 2-Control+V: administración oral de V (35 %) en las 3 últimas semanas; 3-FFR: administración de fructosa al 10% en el agua de bebida; y FFR+V: ídem 2 y 3. Se registró la presión sistólica (PAS) durante el tratamiento y, a su finalización, se determinaron la tolerancia a una carga oral de glucosa (2g/Kg) (TTOG), la actividad de óxido nítrico sintasa endotelial en corazón (eNOS), la actividad de NADPH oxidasa en aorta por quimioluminiscencia y se estimó la liperoxidación, por formación de TBARS en plasma. El remodelamiento vascular se observó en arterias carótidas, mediante el espesor de la media y la relación luz/media. Los datos (media±sem) se procesaron por ANOVA y post-test de Newman-Keuls.

Grupos	Control	Control+V	FFR	FFR+V
PAS final (mmHg)	105±3	103±3	136±2	128±2
Área TTOG (mmol/L/90min)	596±12	652±3	916±19	884±28
eNOS (dpm/mgP/min)	26.9±1.3	26.3±0.6	22.3±4.5	28.6±0.5
NADPH oxidasa (c/mg/min)	32.6±3.3	22.8±2.9	50.4±3.9	36.0±7.7
TBARS (mmol/L)	1.02±0.03	0.72±0.1	1.4±0.1	0.85±0.1
Espesor media (µm)	15.0±0.3	15.0±0.2	23.4±0.7	15.2±0.2
Relación luz/media	21.1±0.9	21.0±0.4	7.8±0.2	20.9±0.5

El tratamiento con Vino Malbec revirtió los cambios asociados al desarrollo del modelo FFR, sugiriendo la utilidad de los antioxidantes naturales en la prevención y/o reversión de algunos de las alteraciones asociadas a esta patología.

870. (7905) CORRELACIÓN ENTRE HIPERTROFIA DE MIOCITOS Y FIBROSIS REACTIVA EN ZONAS ALEJADAS AL INFARTO DE MIOCARDIO EN CONEJO. MONROY, SILVINA; PÉREZ, SUSANA; ARAGÓN, MARTÍN; RODRÍGUEZ, MANUEL; GONZÁLEZ, GERMÁN E.; GELPI, RICARDO J.; MORALES, CELINA

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA

Es conocido que luego del infarto de miocardio (IM), las zonas alejadas al mismo (septum, S y ventrículo derecho, VD), participan en el remodelamiento ventricular mediante la hipertrofia de los miocitos y la fibrosis reactiva intersticial. Sin embargo, la relación entre estas variables en diferentes áreas de miocardio no es conocida. El objetivo del presente trabajo fue correlacionar la hipertrofia de los miocitos y la concentración de colágeno en zonas remotas al infarto de miocardio (S y VD), en conejos sacrificados a diferentes tiempos de evolución post-infarto. Se utilizaron 31 conejos neozelandeses que fueron sometidos a ligadura de la arteria coronaria descendente anterior y sacrificados a los 2 (n=4), 6 (n=3), 8 (n=2), 12 (n=3), 14 (n=4), 18 (n=3), 26 (n=3), 35 (n=3) y 56 (n=4) días post-IM. Se utilizó un grupo de animales normales como control (n=2). Los corazones fueron fijados en formol, cortados de punta a base y teñidos con hematoxilina-eosina y picrosirius red. Mediante analizador de imágenes, se evaluaron el diámetro transversal de los miocitos y la concentración de colágeno. Se realizaron correlaciones entre ambas variables en S y VD en cortes con y sin IM en la pared libre del ventrículo izquierdo (VI). El tamaño de IM (X±ES)

fue $25 \pm 3.8\%$. En el septum de cortes con IM y sin IM hubo correlación entre ambas variables evaluadas ($y=1.56x+14.11$, $n=31$, $r^2=0.14$, $p=0.03$; $y=1.67x+12.21$, $n=25$, $r^2=0.36$, $p=0.001$, respectivamente). Sin embargo, no hubo correlación de dichas variables en ventrículo derecho de cortes con IM y sin IM ($y=0.75+13.10$, $n=28$, $r^2=0.07$, $p=0.18$; $y=-0.04x+14.07$, $n=24$, $r^2=0.03$, $p=0.92$, respectivamente). En los cortes con y sin IM de VI, la hipertrofia de los miocitos y la fibrosis intersticial en septum compartirían mecanismos fisiopatológicos similares, posiblemente debido a las condiciones de carga aumentadas en VI. Sin embargo, en el VD de ambos cortes no se pudo establecer dicha correlación.

871. (7908) DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN CORAZÓN DE RATAS SHR: EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA). PIOTRKOWSKI, BARBARA; CAVANAGH, ELENA MV; FRAGA, CESAR G.

Fisicoquímica-PRALIB, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA

La hipertensión estaría asociada a alteraciones de la función mitocondrial (FM) debidas a la interacción entre oxidantes y componentes celulares. La sobreactivación del SRA es una fuente fisiológica de oxidantes. Previamente encontramos que el bloqueo del SRA, disminuye la presión arterial (PAS) en ratas SHR asociado con aumentos en la protección antioxidante, regulación de la producción de óxido nítrico (NO) y preservación de la FM en riñón. Objetivo: investigar si en la hipertensión los efectos del enalapril sobre la FM y la producción de NO están relacionados con la reducción de la PAS. Para ello ratas SHR recibieron agua de beber: con dosis no hipotensoras de enalapril (10mg/kg.día, ENAL) o sin adiciones (SHR). Ratas Wistar Kyoto (agua sin adiciones, WKY) fueron controles normotensos.

* $p < 0.05$ vs WKY. # $p < 0.05$ vs SHR

	WKY	SHR	ENAL
PAS (mmHg)	120 ± 2	193 ± 17*	216 ± 11*
Peso Corazón (g)	0.76 ± 0.03	1.6 ± 0.1*	1.20 ± 0.04*#
Potencial membrana mitocondrial (mV)	135 ± 6	127 ± 5	119 ± 3*
NOS mitocondrial (pmol citrulina/min/mg proteína mitocondrial)	344 ± 78	176 ± 56	499 ± 105#
Mn-Superóxido dismutasa (U/mg proteína mitocondrial)	16 ± 3#	31 ± 7	18 ± 3#
NADH deshidrogenasa (nmol NADH/min/mg proteína mitocondrial)	18 ± 7	5.1 ± 0.9*	9.2 ± 3.0
NOS endotelial (pmol citrulina/min/mg proteínas membranas 100000g)	230 ± 39	132 ± 64	201 ± 46
Proteína NOS endotelial (U.A.)	248 ± 36#	91 ± 29	280 ± 14#

El tratamiento con enalapril no varió la PAS pero modificó parámetros fisiológicos, que se asociaron a mejoras en la FM y la regulación de la producción de NO. Esto sugiere una disociación entre el efecto hemodinámico de enalapril y su acción sobre las mitocondrias en corazón. Subsidio ANPCyT01-08951.

873. (8107) EL SISTEMA DE LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROFINA DIENCEFÁLICO (TRHD) MEDIA LA ELEVACION DE LA PRESIÓN ARTERIAL (PA) EN EL RATÓN OBESO CON HIPERLEPTINEMIA. LANDA, MARIA S; GARCÍA, SILVIA I; BURGUEÑO, ADRIANA L; SCHUMAN, MARIANO L; ALVAREZ, AZUCENA L; GEMMA, CAROLINA; PIROLA, CARLOS J.

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Fac de Medicina, UBA

La TRH regula el gasto energético y la PA. Su sobreexpresión eleva la PA en la rata normal y participa en la hipertensión de las SHR. Con terapia AS o RNAi, vimos que la TRH media el aumento del simpático en ratas obesas como consecuencia del aumento de leptina ya que demostramos que la elevación de la PA por infusión icv de leptina es bloqueada por un AS contra preTRH. Estudiamos el efecto de los RNAi (i) contra el preTRH (TRH-i) y la proteína fluorescente verde (GFP-i) como control, sobre la PAS y el contenido de TRHd en ratones normales black C6BL (B) y en ratones obesos Agouti (AG), que sobreexpresan la proteína agouti, inhibidora del receptor de la alfa-MSH, hiperleptinémicos. Solo el TRH-i fue eficaz en disminuir significativamente los valores aumentados de TRHd y PAS en los AG, sin afectar estas variables en los controles (tabla). Los AG respecto a los controles mostraron una elevación de leptina que correlacionó con el peso corporal $r:0.98$ (tabla) y la PAS correlacionó

con la TRHd en la población total $r:0.56$, ($p < 0.01$, $n=16$). Las hormonas tiroideas T3 y T4 no difirieron entre ningún grupo.

Variable	GFP-i (Black)	TRH-i (Black)	GFP-i (AG)	TRH-i (AG)
Peso Corporal (g)	32.1 ± 1.9	34.5 ± 1.9	50.1 ± 1.9 *	52.5 ± 1.4 *
Leptina (pg/mg)	72.2 ± 230.5	170 ± 230.6	1844 ± 231*	2094 ± 232*
TRHd (pg/mg prot)	390 ± 40	488 ± 35	750 ± 29 *	451 ± 31#
PAS (mmHg)	105 ± 4	108 ± 3	129 ± 4 *	102 ± 6 #

En modelos de obesidad en roedores, la leptina incrementa la PAS a través de un aumento de TRHd y el consecuente aumento de la descarga simpática, en forma independiente de la función tiroidea. Proponemos a la TRHd como mediador importante en la asociación entre la obesidad y la hipertensión.

COMUNICACIÓN INTERCELULAR 4: BIOMEMBRANAS 2 E INTERACCIONES LÍPIDO-PROTEÍNA

874. (6947) FUNCIONALIDAD Y COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA APICAL DE UROTELIO DE MURINOS. SCALAMBRO, MARÍA BELÉN; CALDERÓN, REYNA OLGA

1ª Cat. de Biología celular, Histología y Embriología. Fac. de Medicina, UNC.

Continuando el estudio de los efectos de lípidos dietarios sobre la organización estructural y funcional de la membrana apical del urotelio de mamíferos, se estudió la función de una H+ATPasa de tipo vacuolar (V-ATPasa) presente en una fracción enriquecida de vesículas endocíticas (VE) provenientes de membrana plasmática apical de urotelio de ratas. La actividad de esta enzima se determinó por la fluorescencia emitida por la piranina, indicador sensible al pH y presente en el interior de las VE. Tres grupos de ratas se alimentaron con las siguientes dietas: comercial (control), maíz (M) y oleína (O), respectivamente. Al término del tratamiento las vejigas fueron lavadas, previo ligado de uréteres, con HEPES e inyectadas con una solución de piranina (10 mM). Luego fueron sometidas al procedimiento hipotónico-isotónico de Lewis & de Moura que estimula sucesivamente la inserción de vesículas en la superficie apical y la endocitosis del fluorescente del fluido luminal. Las VE se aislaron por centrifugación diferencial en gradiente de sucrosa. El control de la endocitosis fue analizado por el incremento de la IF después del tratamiento de las VE con Tritón X-100 (lisis). La presencia del quencher (DPX), disminuyó o apagó la fluorescencia liberada. La IF a diferentes tiempos después del agregado de ATP y Mg²⁺ fue indicativa de la actividad de la V-ATPasa. En VE de maíz y control se observó una disminución del 50% en la IF/0.1mg de proteína a los 5 min. Igual disminución fue observada a los 20- 25 min en las VE de oleína indicando un retardo de la actividad de la V-ATPasa. Nuestro grupo reportó cambios en la composición y en la organización ultraestructural característica del urotelio en condiciones de dieta oleína, comparado con dietas control y maíz. Estos cambios se correlacionan con los presentes y sugieren un efecto diferencial de las dietas que afectan las interacciones lípido/proteína. Dado el carácter pro-tumorigénico de la dieta oleína los cambios podrían significar alteraciones prematuras de lesiones cancerígenas.

875. (7062) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MTNOS POR EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL. VALDEZ, LAURA BEATRIZ; ZAORNYJ, TAMARA; BOVERIS, ALBERTO

Laboratorio de Radicales Libres (PRALIB-CONICET), Fisicoquímica, Fac de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Las mitocondrias de hígado, cerebro, timo, riñón, diafragma y corazón de rata producen NO, a través de la actividad de una óxido nítrico sintasa constitutiva de la membrana interna (mtNOS), iden-

tificada como la isoforma nNOS-alfa con un patrón de acilación diferente al de la eNOS, y con el extremo C-terminal fosforilado. El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de NO en los estados fisiológicos mitocondrial 4 y 3 y su relación con el potencial de membrana mitocondrial (PMM). La actividad de mtNOS se determinó en función del pH del medio de reacción. La actividad enzimática máxima en membranas submitocondriales de hígado y riñón se obtuvo a pH 7.4, siendo la producción de NO de 1.37 ± 0.16 y 0.86 ± 0.05 nmol/min.mg prot., respectivamente. La transición estado 4/estado 3 modificó la liberación de NO de mitocondrias acopladas: las velocidades de producción en estado 3 fueron 40-50% menores que en estado 4. Se determinó el PMM y la liberación de NO en presencia de inhibidores de la cadena de transporte de electrones y de desacoplantes de la fosforilación oxidativa. Las velocidades de liberación de NO (en nmol/min. mg prot.) más altas fueron las correspondientes al estado 4 y en presencia de oligomicina (1.3-1.4), valores intermedios se observaron en estado 3 (0.79) y los valores bajos (0.49) en presencia de antimicina y el desacoplante m-CCCP. La liberación de NO por mitocondrias de hígado fue dependiente del voltaje, observándose altas velocidades asociadas a altos PMM. Esta dependencia es más importante a valores de PMM fisiológicos (200-240 mV) donde, pequeños cambios de voltaje producen grandes modificaciones en la liberación de NO. La transición estado 4/estado 3 regula la producción de NO a través del cambio en el potencial de membrana y no por el pH intramitocondrial. La dependencia de la actividad de mtNOS con el estado metabólico y el potencial de membrana robustece la noción de la regulabilidad y del papel regulador del NO en las funciones fisiológicas mitocondriales.

876. (7701) PROTEOLIPOSOME CONSTITUTED BY ANTIGENIC PROTEINS: BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION AND ITS APPLICATION AS A POTENTIAL VACCINE AGAINST PASTEURILLOSIS. CIANCAGLINI, PIETRO; DAGHASTANLI, KATIA R.P.; MAGGIO, BRUNO; NOMIZO, AURO; FERREIRA, RINALDO B.; THEDEI, GERALDO JR.

FFCLRP-USP, Br; Facultad Ciencias Químicas UNC, Ar; FCFRP-USP, Br; Universidade de Uberaba, Br.

The objective of this work is to obtain a proteoliposome able to carry and deliver antigenic membrane proteins of *Pasteurella multocida* which can be used as a vaccine against pasteurilosis. An important step to achieve high yield protein incorporation in proteoliposomes is to study the most suitable lipid composition. We compared the amount of total protein, reconstituted by cosolubilization into liposomes of phospholipids with different polar head groups and acyl chain lengths. The liposomes and proteoliposomes were characterized by isopycnic centrifugation in sucrose gradient and by dynamic light scattering. Experimental and theoretical results were compared considering the effects exerted on the hydrocarbon chain length, volume and optimal cross-sectional area of the phospholipid (combined in the geometrical critical packing parameter, lipid-protein matching), critical spontaneous radius of curvature of the bilayer vesicle, phase transition temperature of the lipid and ratio of lipid/protein. The highest protein incorporation (93%) was achieved using DPPC. The protein incorporation induces a proportional enhancement of vesicular dimension, since DPPC-proteoliposomes have an average diameter of 185 nm, compared to the 140 nm for pure DPPC vesicles. The immunization tests (intramuscular injections) were performed using $10(5)$ CFU thermal attenuated bacteria and aluminum hydroxide as adjuvant or DPPC-proteoliposome with 0.3 mg of antigenic proteins in the absence of aluminum hydroxide. Using the proteoliposome system, a single immunization was needed to archive 100% of protection against the experimental infection by peritoneal route and 80% by nasal route while the attenuated bacterium protected only 30% of the animals. The attenuated bacteria presented 70% of protection when three prop fortnightly immunization were performed. Financial supports: FAPESP, CNPq, CONICET, CAPES-SECyT.

877. (7733) NA,K-ATPASE RECONSTITUTED IN LIPOSOMES: EFFECTS OF LIPID COMPOSITION ON HYDROLYTIC ACTIVITY AND ENZYME ORIENTATION. SANTOS, HERICA DE LIMA; MAGGIO, BRUNO; CIANCAGLINI, PIETRO

FFCLRP-USP, Depto Química, Br Facultad Ciencias Químicas, UNC, Ar.

A condition of foremost importance for enzyme reconstitution is the achievement of complete solubilization of the lipid in the initial stage of the cosolubilization process for the subsequent formation of the liposomes and/or proteoliposomes. PC-liposomes showed that increasing the fatty acid chain length increases the percentage of Na,K-ATPase incorporated. The average diameter of the proteoliposomes also increases in proportion, reaching a maximum with phospholipids with 16 carbon chains, resulting in 75.1% protein reconstitution and 319.4 nm diameter size, respectively. Binary lipid systems with PC and PE were efficient for incorporation of Na,K-ATPase, depending on the lipid:protein ratio used, varying from 15% to 80% recovery of total ATPase activity. The best results for Na,K-ATPase reconstitution using PC and PE mixture were obtained using a lipid:lipid ratio 1:1 (w/w) and lipid:protein 1:3 (w/w). Integrity studies using calcein release mediated by detergent or alamethicin, in association with inhibition of ATPase activity (ouabain and vanadate) showed that the enzyme is oriented inside-out in DPPC:DPPE proteoliposomes. In these vesicular systems, the enzyme is reconstituted with about 78.9% ATPase activity recovery and 89% protein incorporation, with an average diameter of 140 nm. Systems constituted by DPPC:DPPE, DPPC:DLOPE or DLOPC:DLOPE showed approximately 80, 71 and 70% of recovery of total ATPase activity, but no homogeneity in the distribution of Na,K-ATPase orientation. Reconstitution of Na,K-ATPase in PC:PE:cholesterol systems (2:2:5 mol ratio) showed recovery of about 85% of its total ATPase activity. The results point to an important effect of the lipid acyl chain length and lipid-protein ratio in relation to the composition of the lipid matrix to finely tune the structural asymmetry and the amount of enzyme that can be incorporated a lipid bilayer vesicle while preserving membrane permeability. FINANCIAL SUPPORTS: FAPESP, CNPq, CONICET and CAPES-SECyT

878. (7883) MODELO MATEMÁTICO DE LA PERMEABILIDAD OSMÓTICA EN CÉLULAS RENALES. CHARA, OSVALDO; RIVAROLA, VALERIA; FORD, PAULA; PARISI, MARIO; CAPURRO, CLAUDIA

Laboratorio de Biomembranas, Depto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, UBA

Previamente reportamos las características de permeabilidad osmótica transepitelial ante cambios de la osmolaridad serosa o mucosa ($P(\text{osm})[s]$ o $P(\text{osm})[m]$). Para ello empleamos dos líneas celulares provenientes del Túbulo Colector Renal de Rata: WT-RCCD(1), la cual no expresa canales específicos para el agua (acuaporinas), y AQP2-RCCD(1), establemente transfectada con acuaporina-2. Nuestros resultados mostraron que ante gradientes hipertónicos existe una asimetría en el transporte de agua, independientemente de la expresión de acuaporina-2 ($P(\text{osm})[s] > P(\text{osm})[m]$). Por el contrario, los gradientes hipotónicos sólo indujeron asimetría en presencia de acuaporinas. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un modelo matemático para explicar los valores de permeabilidad osmótica experimentales así como sus eventuales asimetrías. El presente modelo fue formulado mediante suposiciones tales como el teorema de continuidad o las leyes fenomenológicas de la ósmosis. Este está conformado por una ecuación diferencial que se resolvió numéricamente mediante el método de Euler. Para la simulación del modelo se implementó un programa en Visual-Basic y se efectuaron corridas con el objeto de extraer los parámetros tales que sus variables ajustaran mejor a los valores experimentales. Dichos parámetros son las permeabilidades de la membra-

na apical (Pa) y basolateral (Pb). Demostramos que, en nuestro modelo, para satisfacer las asimetrías halladas, Pa y Pb deben ser dependientes de la osmolaridad externa. Por otra parte, el modelo predice permeabilidades para Pa significativamente mayores en las células transfectadas con acuaporina-2 que en las células nativas, consistentemente con nuestros resultados experimentales ($p < 0,001$). El modelo permite concluir que la osmolaridad externa determinaría la permeabilidad osmótica transepitelial mediante la modulación de las permeabilidades individuales.

879. (7884) ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES LÍPIDO-PROTEÍNA UTILIZANDO UN REACTIVO FOTOACTIVABLE.
VILLAMIL GIRALDO, ANA MARÍA; CASTELLO, PABLO RAÚL; GONZÁLEZ FLECHA, FRANCISCO LUIS; DELFINO, JOSÉ MARÍA; ROSSI, JUAN PABLO

IQUIFIB. Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A. Junín 956. Buenos Aires, Argentina.

El análisis de la interacción entre fosfolípidos y proteínas integrales de membrana permite obtener información acerca de la estructura y la función de estas proteínas. Utilizando un análogo fotoactivable de fosfatidilcolina ([125I] TID-PC/16) hemos estudiado el entorno lipídico de tres proteínas transportadoras pertenecientes a la familia de P-ATPasas: la bomba de calcio de membrana plasmática (PMCA), la bomba de calcio de retículo sarcoplásmico (SERCA) y la bomba de sodio. Las proteínas fueron solubilizadas en micelas mixtas conteniendo detergente y [125I] TID-PC/16 y marcadas en presencia de distintas concentraciones de fosfatidilcolina. Se aislaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y se midió la cantidad de marca radiactiva asociada a las mismas. Teniendo en cuenta el rendimiento de la reacción de fotomarcación previamente determinado, calculamos el número de moléculas de fosfatidilcolina en contacto directo con la región transmembránica de cada una de las proteínas. Los resultados muestran que la superficie transmembránica de la PMCA esta cubierta por 17 ± 2 moléculas de fosfatidilcolina. Los valores obtenidos para la SERCA y la bomba de sodio son de 18 ± 3 y 29 ± 4 moléculas de PC/molécula de proteína respectivamente. Estos resultados son compatibles con los obtenidos por distintos autores utilizando técnicas espectroscópicas y con la estructura cristalina de la SERCA. Los resultados experimentales muestran el desarrollo de una técnica experimental sencilla que permite determinar la estequiometría lípido-proteína en: a) preparaciones en las que la proteína de membrana se encuentra en baja concentración; b) en preparaciones en las que varias proteínas se encuentren simultáneamente presentes.

880. (7941) ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE FROM HUMAN PLACENTA IN LANGMUIR-BLODGETT FILMS.
CLOP, EDUARDO M.(1); SARTORI, MARIA J.(2); DE FABRO, S.P.(2); PERILLO, MARIA A.(1)

(1) Biofísica-Química. Dto. Química. F.C.Ex.Fís.y Nat. U.N.C. Av. V.Sarsfield 1611, Córdoba (2) Cat. de Hystol., Embr. y Genet. FCSMed. U.N.C.

Placental alkaline phosphatase (PLAP) is an enzyme anchored to placental membranes through a GPI moiety. This protein was proposed as a target for *Trypanosoma cruzi*. As a membrane bound protein its kinetics as well as physiological activity may depend on the membrane molecular organization. In addition, Langmuir-Blodgett films may be useful to understand the effects of molecular packing on PLAP activity. In the present work we prepared Langmuir films from purified human placental membranes. The membrane aqueous suspension was transferred to an air-water interface, the stability and rheological properties of the monomolecular layers (MML) obtained were studied. These MML were transferred to a hydrophobic solid and plane substrate (Langmuir-Blodgett film: LB). First the kinetic parameters of the hydrolysis of pNPP at 37°C with and without previous heating during 15 minutes at 60°C were obtained from membrane aqueous suspension, and were almost the same ($K_m, 37^\circ C =$

3.123 ± 0.58 mM y $K_m, 60^\circ C = 2.23 \pm 0.57$ mM and $V_{max}, 37^\circ C = 0.127 \pm 0.00627$ and $V_{max}, 60^\circ C = 0.1157 \pm 0.00613$ (umol/min/mg protein). This indicated that PLAP was the only phosphatase present in the samples. The surface pressure (π) - area isotherms of the placental MMLs showed a collapse $pc = 44$ mN/m and showed a hysteresis in the compr-decompression cycle. The compressibility modulus was 36 and increased up on successive cycles indicating the lost of proteins from the interface. The membrane transference rate to solid substrates ranged from 0.879 to 1.467. The kinetics of PLAP in LB stabilized at a surface pressure of 35 mN/m was sigmoidal with $K_{0.5} = 1.992 \pm 0.174$ mM, $V_{max} = 0.2056 \pm 0.0091$ umol/min/mg protein and a Hill coefficient of 0.69 ± 0.154 . This kinetics behavior and increasing in V_{max} might be related with the geometrical distributions of PLAP in the surface, that will induce a cooperative phenomena as we reported previously for b-galactosidase in LB films. This will be evaluated by atomic force microscopy. Supported by CONICET, SeCyT-UNC and ACC

881. (7972) EFECTO DE LA ARBUTINA SOBRE LAS PROPIEDADES INTERFACIALES DE MEMBRANA DE FOSFATIDILCOLINA. FRÍAS, MA.DE LOS A.(1); ALE, N.M.(1); DIAZ, S.B.(1); DISALVO, E.A.(2)

(1) Instituto de Qca Fca. Fac.de Bioqca, Qca y Fcia. U. N. de Tucumán; (2) Laboratorio de Físicoquímica de Membranas Lipídicas. Fac. de Fcia y Bioqca. U.B.A. Junín 256.Bs.As.

La arbutina (hidroxiquinona β -D-glucopiranosido) es un componente natural en las hojas de plantas que pueden sobrevivir largos períodos con bajos contenidos de agua. También se conoce que este compuesto puede actuar como inhibidor de la fosfolipasa A2. Esta enzima actúa en la zona de los carbonilos de las uniones ésteres, uno de los centros de hidratación de las membranas lipídicas, produciendo lisofosfatidilcolina y ácidos grasos libres. Por lo tanto es de interés conocer como la arbutina puede reemplazar agua en la interfaz membrana solución. En este trabajo se demuestra que la arbutina afecta la inserción de lisofosfatidilcolina a membranas de dimiristoilfosfatidilcolina. A medida que aumenta la concentración de arbutina el efecto lítico de este derivado decrece en fase gel, mientras que no la modifica cuando la membrana está en fase líquido cristalina. Medidas de espectrometría FTIR muestran que la arbutina se liga a los grupos fosfatos en presencia de agua deuterada con mayor intensidad que la sacarosa pero menos que la trehalosa. Asimismo, la arbutina interacciona con los grupos carbonilos de los fosfolípidos con mayor intensidad que la trehalosa. Este resultado es indicativo de que la arbutina actuaría como espaciadora entre los lípidos, lo cual es congruente con la inserción de los lisolípidos en membranas en estado gel. Se discute la posibilidad que la arbutina induzca regiones fluidas en membranas en estado gel, en la cuales se podría insertar los lisofosfolípidos.

882. (8127) HÉLICES ANFIPÁTICAS DE APOLIPOPROTEÍNA A-I HUMANA INVOLUCRADAS EN LA ESTIMULACIÓN DE LA REMOCIÓN DE COLESTEROL EN CÉLULAS DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO (CHO). GONZALEZ, MARINA C; TOLEDO, J. D.; TRICERRI, A; GARDA, H.

INIBIOLP (CONICET-UNLP). INIBIOLP (CONICET-UNLP). Facultad de Ciencias Médicas. Calles 60 y 120. 1900-La Plata.

La apolipoproteína A-I (apoA1) juega un rol clave en la remoción de colesterol de tejidos periféricos. La interacción de apoA1 con sitios específicos de la membrana celular desencadena la movilización de depósitos intracelulares de colesterol como el pool disponible para esterificación por la acil-CoA aciltransferasa (ACAT). Si bien esta proteína está constituida casi exclusivamente por hélices anfipáticas, hemos demostrado anteriormente que su interacción con membranas artificiales es mediada por un dominio central que contiene dos hélices con una distribución particular de cargas (tipo Y) en su cara polar. Un péptido sintético

con la secuencia de este dominio (AI 77-120) presentó similar capacidad que apoAI para unirse selectivamente a membranas ricas en colesterol y promover su desorción. Se investigó el rol de estas hélices centrales en la interacción de apoAI con células y su capacidad de desencadenar la movilización del colesterol celular. Se utilizaron cultivos de células CHO para comparar la actividad de remover colesterol y disminuir el pool de colesterol disponible para ACAT de: a) apoAI aislada de suero humano, b) péptido AI 77-120 con la secuencia del dominio central, c) un mutante natural de apoAI con una delección en el dominio central (AI 0_K107), y d) un mutante cuyas dos hélices centrales fueron reemplazadas por otras dos hélices Y del extremo C (AI H10_H4). Los resultados con AI 77-120 indican que las dos hélices centrales serían suficientes para desencadenar la movilización de colesterol disponible para ACAT y promover la salida de colesterol. El mutante AI 0_K107 fue inefectivo para producir dichos efectos, lo cual podría atribuirse a la eliminación de la carga positiva, o a la disrupción de la orientación adecuada entre caras hidrofóbicas e hidrofílicas. Por otro lado AI H10_H4 fue activo para desencadenar estos procesos, sugiriendo que más que una secuencia específica se requeriría una distribución de cargas tipo Y en la cara polar.

883. (8128) ALPHA-HEMOLISINA DE ESCHERICHIA COLI FORMA POROS PROTEO-LIPIDICOS EN MEMBRANAS.
HERLAX, V. (1); BAKAS, L. (1,2)

(1) INIBIOLP- *Fac de Cs. Médicas, UNLP*; (2) *Fac.de Cs Exactas, UNLP (1900) La Plata*

La Hemolisina (HlyA) es una toxina proteica (107 kDa) secretada por *Escherichia coli* que actúa a nivel de la membrana plasmática de las células eucarióticas. En este trabajo se presenta un estudio de la interacción de esta toxina con membranas empleando membranas lipídicas bimoleculares. Para todas las composiciones estudiadas el agregado de concentraciones nanomolares resulta en un incremento en la conductancia de la bicapa y una disminución de la estabilidad de la membrana. El incremento de conductancia fue dependiente del potencial, siendo el incremento en la conductancia más rápido cuando se aplicaron potenciales positivos del lado cis. Los registros mostraron fluctuaciones de corta duración las cuales no son típicas de los canales proteicos. Los histogramas de conductancia mostraron una dependencia con la composición, con una amplia distribución en el caso de DOPE, y más estrechos para DOPC y DOPC/LPC con máximos a 0.34, 0.40 y 0.22 nS respectivamente. La desestabilización de la bicapa fue cuantificada a partir de medidas de la vida media de la membrana en función del voltaje aplicado. HlyA disminuye la vida media en 3 órdenes de magnitud en función del voltaje. La presencia de lípidos no lamelares con curvatura positiva como lisofosfatidilcolina (LPC) reduce significativamente la desestabilización de la membrana inducida por HlyA. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos por ensayos de pérdida de marcadores fluorescentes encapsulados en liposomas. Paralelamente, medidas de la capacitancia específica están de acuerdo con un incremento en el espesor de la bicapa. De acuerdo con la teoría de formación de poros lipídicos HlyA produce una disminución en la tensión lineal del poro. Este es un parámetro clave en la formación de poros lipídicos, ya que da una medida de la energía requerida para formar los bordes del poro. Nosotros sugerimos que esta toxina actúa promoviendo la formación de poros formados por complejos supramoleculares lípido-proteína.

884. (8129) CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LA INTERACCIÓN DE APOLIPOPROTEÍNA AI Y LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO. HENNING, M. F. (1); GARDA, H. (1); BAKAS, L. (1,2)

(1) INIBIOLP- *Fac de Cs. Médicas, UNLP* (2) *Fac.de Cs Exactas, UNLP (1900) La Plata*

La sepsis por bacterias Gram negativas continúa siendo uno de los mayores problemas a pesar de los avances realizados en

la terapia antimicrobiana. Los lipopolisacáridos (LPS) liberados de la membrana externa producen múltiples efectos fisiopatológicos y en casos graves muerte por shock séptico. Existen algunas evidencias que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) unen y neutralizan LPS. La Apolipoproteína AI (Apo AI), principal componente de las HDL, pareciera ser la responsable de este efecto. Sin embargo, el efecto que esta interacción tiene sobre la estructura y función de la Apo AI no ha sido estudiado aún. Por ese motivo, hemos estudiado el proceso de micelización de liposomas de dimiristoilcolina (MLV-DMPC) por acción de Apo AI en presencia de LPS. La Apo AI forma complejos micelares al interactuar con MLV (DMPC) a 25°C a una relación lípido: proteína 100:1 (mol:mol). La cinética de micelización de MLV cuantificada por la disminución de turbidez de las suspensiones de DMPC mostraron que en presencia de LPS la micelización tiene lugar a la misma velocidad inicial, pero su extensión disminuye a 62 % y 37 % cuando la proteína fue preincubada previamente con LPS en relación 1:0.1 o 1:1 Apo AI:LPS respectivamente. Los productos de micelización identificados por electroforesis en condiciones nativas revelaron que los complejos formados contienen 3 moléculas de ApoAI por partícula en ausencia de LPS, sin embargo en presencia de LPS contienen solo 2 moléculas de ApoAI. Paralelamente se detectó una disminución en la fluorescencia intrínseca de Apo AI en presencia de LPS. Finalmente, estudiamos el efecto del LPS sobre la Temperatura de transición gel-líquido cristalina de MLV de DMPC empleando Merocianina 540, sin detectar, a las relaciones Apo AI -LPS estudiadas, cambios en la Tt. Por lo tanto, podemos concluir que los efectos observados en el proceso de micelización son causa de una interacción Apo AI-LPS y no a modificaciones en la membrana.

ENDOCRINOLOGÍA 5

885. (6796) METABOLISMO LIPIDICO MAMARIO Y HEPATICO EN RATAS VIRGENES. EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO. HAPON, MARIA BELEN; JAHN, GRACIELA ALMA; GIMENEZ, MARIA SOFIA

IMBECU-CRICYT, Lab. de Bioq. Molecular. Dep. de Bioq y Cs. Biol. Fac. Quic., Bioq. y Farm. UNSL

La diferenciación mamaria está regulada hormonalmente, sobre todo por PRL. En ratas vírgenes el hipotiroidismo (hipoT) produce pseudopreñeces repetidas y desarrollo mamario asociado a niveles elevados de PRL y Pg. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del hipoT sobre el metabolismo lipídico mamario y hepático en estas ratas. Ratas vírgenes de la cepa Wistar se trataron por 30 días con el anti-tiroideo propiltiouracilo (PTU) (0,1 g/L) en el agua de bebida. Los lípidos (lípidos totales, colesterol libre y esterificado, fosfolípidos y triglicéridos) se separaron por TLC y determinaron por reacciones colorimétricas. La expresión relativa a L19 de enzimas de síntesis y metabolismo lipídico (FAS, ACC, GPAT, ACO, CPT, LPL, 7 alfa hidroxilasa, receptor de LDL, HMGCoAR) se midió por RT-PCR. Se midió glucosa, proteínas totales, albúmina, lípidos totales, triglicéridos, fosfolípidos, colesterol total y HDL por métodos colorimétricos o enzimáticos y hormonas séricas (T3, T4, TSH, corticosterona, GH, PRL, Pg, Insulina) por RIA. En suero las ratas hipoT tuvieron GH (Co: 9.4±1.4 vs hipoT: 5.8±0.3 ng/ml), corticosterona (Co: 903±174 vs hipoT: 370±82 ng/ml), glucosa (Co: 1.05 ± 0.03 vs hipoT: 0.84±0.04 mg/ml) e insulina (Co: 7.19±0.81 vs hipoT: 3.66±0.68 ng/ml) disminuídos mientras que los lípidos séricos aumentaron (Co: 1.58±0.16 vs hipoT: 2.39±0.15 mg/ml) a expensas del aumento en la fracción de colesterol VLDL +LDL (Co: 0.15±0.04 vs hipoT: 0.40±0.02 mg/ml). En hígado hubo aumento en los fosfolípidos (Co: 0.49±0.05 vs hipoT: 0.65±0.02 mg/P/g) y disminución en la expresión de ACC (Co: 3.16±0.63 vs hipoT: 0.81±0.14), FAS (Co: 2.00±0.48 vs hipoT: 0.89±0.11) y GPAT (Co: 0.65±0.08 vs hipoT: 0.36±0.09). En GM la expresión de FAS (Co: 0.99±0.11 vs hipoT: 2.00±0.44) aumentó significativamente, mientras que las demás enzimas tuvieron una tendencia al au-

mento. En ratas vírgenes el hipoT disminuye la síntesis lipídica a nivel hepático y la aumenta a nivel mamario como consecuencia del desarrollo mamario de las ratas hipoT.

886. (6797) EVOLUCION DE LAS PROPIEDADES BIOMECA-NICAS OSEAS EN RATAS CON DETENCION DEL CRE-CIMIENTO POR HIPOFISECTOMIA. ALIPPI, ROSA M.; OLIVERA, MARIA I.; HUYGENS, PATRICIA; META, ISAAC F.; BOZZINI, CARLOS E.

Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Univer-sidad de Buenos Aires; Bio Sidus S.A. Hueso

La hipofisectomía disminuye la ganancia de masa ósea por detención del crecimiento del esqueleto. El objetivo de este proyecto fue investigar la evolución del comportamiento biomecánico del hueso cortical diafisario femoral en ratas S-D hipofisectomizadas (Hx) a los 30 d de edad (prepubertad) y analizadas 6 meses después (adultez), comparándose los resultados con los correspondientes a ratas controles (C) prepúberes. Las propiedades mecánicas del hueso fueron evaluadas mediante el test de flexión a 3 puntos en un equipo Instron modelo 4442. Los resultados son presentados en la Tabla, que muestra las propiedades estructurales y geométricas de la sección transversal femoral, así como las propiedades intrínsecas del tejido óseo.

Parámetro	Control	Hipofisectomía	P
Rigidez, N/mm	27,96 ± 4,99 (DS)	97,30 ± 28,44	< 0,005
Límite elástico, N	9,95 ± 4,38	34,02 ± 5,23	<
Carga de fractura, N	13,58 ± 5,84	42,23 ± 5,93	<
Area sección transversa, mm ²	3,18 ± 1,12	2,70 ± 0,57	> 0,05
Momento de inercia, mm ⁴	1,85 ± 0,76	0,84 ± 0,29	< 0,05
Diámetro externo, mm	3,20 ± 0,30	2,30 ± 0,30	<
Diámetro interno, mm	2,30 ± 0,30	1,50 ± 0,30	<
Estrés elástico mx, N/mm ²	18,13 ± 9,52	150,98 ± 42,26	< 0,01
Módulo de Young, N/mm ²	588,5 ± 238,7	6316,3 ± 588,5	< 0,05

Las propiedades asociadas con la capacidad resistiva de la diáfisis femoral aumentaron significativamente en las ratas Hx. Como los animales Hx no variaron el peso en función del tiempo en relación a los C, el hueso estudiado presentó excesiva rigidización.

887. (7104) ACCIÓN DE ISOFORMAS DEL TGF-β EN CÉLU-LAS TIROIDEAS NORMALES Y TUMORALES. AGOTE ROBERTSON, MARCOS; GAMBA, ALICIA; THOMASZ, LISA; JUVENAL, GUILLERMO; PISAREV, MARIO

Radiobiología, CNEA, Fac Medicina, UBA.

La familia del TGF-β comprende tres isoformas, y teniendo en cuenta que no se conoce el posible papel de éstas en la regulación tiroidea, se analizó el efecto de estas isoformas sobre la proliferación de líneas celulares humanas de cáncer tiroideo con diferente grado de indiferenciación (folicular, papilar e indiferenciado). Se emplearon las siguientes líneas celulares humanas: línea celular WRO (cáncer folicular), línea celular NPA (cáncer papilar) y línea celular ARO (cáncer anaplásico). La línea celular FRTL-5 se usó como control. Las diferentes líneas se trataron con concentraciones crecientes de las tres isoformas (0,1, 1,0 y 5,0 ng/mL) y el crecimiento fue evaluado por la determinación de ADN. Resultados: Los % de inhibición del crecimiento fueron los siguientes: TGF-β1 (0,1, 1,0 y 5,0 ng/mL): línea FRTL-5: 21, 41 y 56; línea WRO: 0, 37 y 50; línea NPA: 0, 8 y 20; línea ARO: 4, 6 y 24 TGF-β2 (0,1, 1,0 y 5,0 ng/mL): línea FRTL-5: 21, 43 y 55; línea WRO: 15, 34 y 53; línea NPA: 0, 13 y 43; línea ARO: 5, 9 y 37; TGF-β3 (0,1, 1,0 y 5,0 ng/mL): línea FRTL-5: 18, 40 y 55; línea WRO: 55, 59 y 65; línea NPA: 0, 11 y 41; línea ARO: 3, 5 y 23. a) En las células FRTL-5 las tres isoformas mostraron un grado similar de inhibición, observándose una relación dosis-respuesta con los tres isoformas. b) Las células

tumorales también mostraron una inhibición del crecimiento con los tres isoformas siendo esta inhibición dosis dependiente. c) La sensibilidad a la acción inhibitoria del TGF-β1 y del TGF-β2 disminuye a medida que las células se vuelven más indiferenciadas sugiriendo que la falta de respuesta a ambos isoformas pueda deberse al grado de tumorigenicidad de las líneas celulares. d) La isoforma TGF-β3 parece ser un inhibidor más potente de la proliferación celular que las otras isoformas en la línea celular WRO.

888. (7185) PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES β ADRENÉRGICOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE EN RATAS ADULTAS ESTRESADAS PRENATALMENTE, EXPUESTAS A ESTRÉS AGUDO POR INMOVILIZACIÓN. MAYER, NORA; RODRIGUEZ, N; BERTUZZI, M; ESCUDERO, C; GRECO, C; VIVAS, A; GAUNA, HF

Dpto de Biología Molecular, Facultad de Cs. Exactas, UNRC

El estrés prenatal produjo una disminución del perfil de leucocitos, neutrófilos y linfocitos en sangre periférica en respuesta al mismo estrés agudo en la vida adulta. Esto se correlaciona con la disminución de la corticosterona. Estas alteraciones podrían también deberse a la activación del eje simpato-adrenomedular. El objetivo fue investigar la participación del sistema nervioso simpático en la distribución de los leucocitos provocadas por el estrés agudo en ratas estresadas prenatalmente. Se utilizaron ratas macho adultas estresadas prenatalmente por inmovilización en plancha (IMO), crónico. Se conformaron los siguientes grupos: EP-BE, a las que se administró 4 mg/kg de p.c. de propranolol (bloqueante β adrenérgico), vía i.p. 15 min antes de la sesión de IMO agudo (20 minutos). EP-B, que recibieron el solvente. EP-VE, quienes recibieron el solvente antes de la sesión de IMO y EP-V que solo recibieron el vehículo. Se determinó el número de glóbulos blancos y las subpoblaciones de neutrófilos y linfocitos en sangre periférica extraída al tiempo 0, previo a la administración de la droga o del vehículo según corresponda y a los 20, 60, 90, 120, 150, y 330 minutos de inicio del IMO. El estrés no modifica el perfil de leucocitos, neutrófilos y linfocitos en los animales tratados con propranolol con respecto a sus controles que sólo recibieron el vehículo de la droga. Por lo tanto la redistribución observada en la población leucocitaria no se debería a la acción de las catecolaminas a través de los receptores β adrenérgicos.

889. (7223) LOS PRODUCTOS DE GLICACIÓN AVANZADA INHIBEN EL DESARROLLO OSTEABLÁSTICO INDUCIDO POR BISFOSFONATOS. VAISMAN, DIEGO N.; MCCARTHY, ANTONIO D.; CORTIZO, ANA M.

Cátedra de Bioquímica Patológica, Fac. de Cs. Exactas, Univ Nac de La Plata 47 y 115 (1900) La Plata

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado previamente que los productos de glicación avanzada (AGEs) inhiben la diferenciación y mineralización de osteoblastos en cultivo, posiblemente a través de la interacción de AGEs con receptores específicos de superficie (RAGE y galectina-3). Recientemente hemos encontrado que los bisfosfonatos (BP) como el alendronato ejercen efectos directos y bifásicos sobre el desarrollo osteoblástico. En el presente trabajo se evaluó el efecto conjunto de AGEs y BP sobre la proliferación (bioensayo del cristal violeta) y diferenciación evaluada a través de la producción de colágeno (bioensayo de Sirius red) en osteoblastos MC3T3E1 de ratón, y células de osteosarcoma de rata UMR106. El alendronato (10(-10) - 10(-5) M) estimuló la proliferación osteoblástica (rango: 110-170% basal, p<0.05-0.001), después de 48 h de cultivo. Este efecto fue abolido en presencia de 200 ug/ml de AGE-albúmina. La producción de colágeno fue también estimulada (rango: 110-120% basal, p<0.05-0.001) por el alendronato (10(-10)-10(-7) M). Altas dosis de este BP (10(-5) M) indujeron una leve disminución de la producción osteoblástica de colágeno (90% basal, p<0.05) luego de 48 h de incubación. Los

AGEs (200 ug/ml) inhibieron la producción de colágeno en ambas líneas celulares (93% basal, $p < 0.01$), un efecto que fue revertido por bajas concentraciones de alendronato (10(-8) M). Por otro lado los AGEs acentuaron el efecto inhibitorio de 10(-5) M alendronato (77% basal, $p < 0.01$). En conclusión, los efectos estimulantes de los BP sobre el desarrollo osteoblástico fueron suprimidos en presencia de AGEs. Esto sugiere que los efectos beneficiosos de los BP sobre la formación ósea podrían verse afectados en condiciones de acumulación de AGEs, tales como la Diabetes mellitus y el envejecimiento.

890. (7263) ESTRÉS OXIDATIVO EN TIROIDES DURANTE LA INVOLUCIÓN TEMPRANA DEL BOCIO. THOMASZ, LISA; DAGROSA, ALEJANDRA; KRAWIEC, LEÓN; PISAREV, MARIO; JUVENAL, GUILLERMO

Bioquímica Nuclear, CNEA; Facultad de Medicina, UBA

El yodo además de intervenir en la síntesis de las hormonas tiroideas es un regulador de la función y crecimiento de la tiroides. Uno de los posibles intermediarios sería la 5-hidroxi-6-iodo-eicosatrienoico delta lactona, (IL). Este compuesto reproduce la acción inhibitoria del yodo sobre el crecimiento tiroideo, así como sobre parámetros funcionales. El exceso de yodo provoca un aumento del estado oxidativo celular, peroxidación lipídica y muerte celular. El objetivo fue estudiar el estado oxidativo en tiroides durante la génesis y la involución temprana del bocio provocada por IL. Ratas Wistar fueron inyectadas con 1 mg de PTU durante 7 días. Luego se inyectó 10 ug de IL o de KI. 6hs post inyección se sacrificaron los animales, se obtuvieron sus tiroides y se analizaron las enzimas antioxidantes. Los resultados fueron los siguientes: Peso Tiroides (mg): C: 10 +/- 1,17; PTU: 24,9 +/- 2,4; P + IL: 24,2 +/- 3,5; P+KI: 28,8 +/- 3; IL: 10,37 +/- 1,4; KI: 9,3 +/- 0,5. Catalasa (UE/mg): C: 0,78 +/- 0,28; PTU: 2,26 +/- 0,25 (*); P + IL: 2,8 +/- 0,38 (*); P+KI: 3 +/- 0,44 (*); IL: 1,8 +/- 0,38 (*); KI: 1,22 +/- 0,29 (*). GPx (UE/mg) C: 0,14 +/- 0,02; PTU: 0,25 +/- 0,05 (*); P + IL: 0,31 +/- 0,03 (*); P+KI: 0,35 +/- 0,07 (*); IL: 0,15 +/- 0,02; KI: 0,19 +/- 0,07. Peroxidos (nmoles/mg) C: 204,7 +/- 53,5; PTU: 90,7 +/- 25,6 (*); P + IL: 89,6 +/- 17,2 (*); P+KI: 105 +/- 23,8 (*); IL: 218 +/- 83; KI: 248 +/- 54. Hidroperóxidos (nmoles/ug) C: 0,15 +/- 0,05; PTU: 0,48 +/- 0,06 (*); P + IL: 0,54 +/- 0,09 (*); P+KI: 0,46 +/- 0,08 (*); IL: 0,40 +/- 0,18 (*); KI: 0,59 +/- 0,10 (*); (* $p < 0,05$ o menor vs C La disminución de peróxidos por parte del PTU se explicaría por su efecto depurador de radicales libres. En lo que respecta a los hidroperóxidos y enzimas antioxidantes, el PTU es un inhibidor de la organificación del yodo, aumentando los niveles de H₂O₂. Análogamente, el efecto inhibitorio del yodo y la iodolactona sobre la peroxidasa tiroidea, provocaría un aumento de hidroperóxidos y la consiguiente muerte celular.

891. (7266) VALOR DE LA DETERMINACION TEMPRANA DE LA FUNCIÓN TIROIDEA Y NIVEL DE AUTOANTICUERPOS EN EL EMBARAZO. ALBRIEU, HUGO; ARGUELLO, MARIANO; BUSTOS, LAURA; CHACON, MARIA JOSE; SOJO, MAURICIO; SUESCUN, OLGA

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, IUCS Fundación Barcelo, sede La Rioja

Introducción: La ley Nacional 17.259 establece la yodación de la sal en el país desde 1970. En la Rioja se desconoce la incidencia del hipotiroidismo aunque observaciones aisladas indican que son altos con posibles consecuencias en los recién nacidos. Objetivos: b1- Estudiar la función tiroidea y el nivel de auto-anticuerpostiroideos durante embarazo y puerperio. b2-Establecer un esquema de screening mínimo acorde a la realidad económica de la zona, b3- Promocionar la importancia de las alteraciones tiroideas en embarazadas y su relación con la salud materno-infantil, b4- Analizar una posible relación de la hipotiroxinemia del primer trimestre, con el alto grado de fracaso escolar provincial. Materiales y métodos: Se obtuvo suero de mujeres concurrentes a centros periféricos de salud de La Rioja durante su embarazo y seis meses posteriores al parto (junio

2003/agosto 2004). Se mide: TSH, FT4, ATPO por Quimioluminiscencia (ACS-180 BAYER), AAM y AATG por Microaglutinación Pasiva (Serodia). Resultados: De 109 embarazadas (R: 14 - 48 años; Media: 25.16) se determinó en primer trimestre: Hipertiroides: 1.8%, Eutiroides: 62.7%, Hipotiroides subclínicas: 30.9% e Hipotiroides: 4.5%. Los ATPO negativos: 69.9%, Positivos: 25.2% y fuertemente positivos: 4.9%. Abortaron 3 pacientes y se pudo seguir la evolución de 89 mujeres; 13 % recibió Hormono Terapia de Reemplazo y control medico mensual; 7.8% desarrollaron tiroiditis pos parto y en ellas el valor positivo de los ATPO de primer trimestre fue pronostico de la patología en un 71.4%. e-Conclusiones: Los resultados muestran una alta incidencia de hipotiroides durante el embarazo sugiriendo la necesidad de vigilancia epidemiológica. El screening más conveniente sería TSH y ATPO antes de la semana 12 de gestación. No podemos establecer la vinculación de los índices encontrados con el fracaso escolar, considerando a este problema para futuros estudios, reconociendo un origen multifactorial.

892. (7655) SECRECIÓN ECTÓPICA DE HORMONA PARATIROIDEA (PTH) POR LAS CELULAS EPITELIALES DEL TIMO. GARCÍA, M¹; D'ADAMO, M¹; BARBICH, M¹; JAEN, A²; MAZZARO, E³; PLANTALECH, L^{*}

*(1) Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires. (2) Anatomía Patológica, (3) Cirugía, * Endocrinología del Hospital Italiano de Buenos Aires.*

El 30% de pacientes con hiperparatiroidismo urémico (HPTu) presenta glándulas paratiroides supernumerarias, 70% que se localizan en el timo. Se ha demostrado un común origen embriológico del timo y las glándulas paratiroides. Algunos autores sostienen que los adenomas intra-tímicos son restos paratiroides embrionarios ectópicos desarrollados por potentes estímulos. Otra hipótesis es que las células de igual origen embrionario (células epiteliales del timo) secreten otras hormonas (PTH) por involución celular a estadios tempranos del desarrollo en presencia de potentes estímulos. Objetivo: Demostrar la secreción de PTH por células epiteliales del timo en circunstancias patológicas. Material y métodos: Muestras provenientes de un adenoma paratiroideo intra-tímico, timo remanente de paciente con trasplante renal e HPTu y timo humano normal como control, se conservaron en formol para realizar estudios histológicos: Hematoxilina Eosina (HE), Inmunohistoquímica para PTH y test de TUNNEL. El tejido tímico del paciente fue cultivado, en medio de D-Mem durante 5 días; se dosó PTH m.m. (fracción medio molecular) en el sobrenadante de éstos y de cultivos de fibroblastos (control). Resultados: Se comprobó valores de PTH 85-215 ng/ml en el sobrenadante de los cultivos de las células tímicas y 25 - 40 ng/ml en cultivos de los fibroblastos. No se observó cambios en la estirpe celular del timo (HE). La inmunohistoquímica para PTH fue positiva en el tejido tímico y adenoma paratiroideo y negativa en el timo control. No se detectó apoptosis celular en ninguno de los tejidos (TUNNEL negativo). Estos resultados preliminares advierten que en condiciones patológicas las células del timo secretan hormona paratiroidea, debiéndose realizar estudios de biología molecular (GCMA y GCMB) y funcionales para dilucidar el origen embriológico y las condiciones desencadenantes de la producción de PTH por las células tímicas.

893. (7671) DESARROLLO DE UN MÉTODO IN VITRO PARA LA EVALUACIÓN FUNCIONAL DE GLÁNDULA PARATIROIDEA. GARCÍA, M¹; D'ADAMO, M¹; LORENTI, A¹; HIDALGO, A¹; FIGARI, M²; GUELMAN, R³; ARGIBAY, P¹

(1) Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires (2) Servicio de Cirugía y (3) Servicio Endocrinología del Hosp Italiano de Buenos Aires

Desarrollar un método in vitro que nos permita evaluar la funcionalidad y viabilidad de las glándulas paratiroides, con mi-

ras a aplicarlo en tejido crioconservado para un potencial trasplante. Materiales y métodos: Se crioconservaron muestras de tejido paratiroideo proveniente de 14 pacientes operados por HPT (8 secundarios, 3 terciarios, 1 primario recidivado y dos hiperplasias primarias). Fraccionados en piezas de 2x3 mm, el material fue preservado en suero + solución de Hanks+ DMSO y congelado hasta -90°C , y conservado en fase gaseosa de Nitrógeno líquido a -196°C . Luego de seis meses el material fue descongelado y estimulado con soluciones de cloruro de calcio midiéndose la secreción de PTH, a estas muestras se les realizó inmunohistoquímica para PTH y se estudio la histología con H-E y método del Tunnel para apoptosis. Resultados: Se observó en las cuatro muestras un patrón similar de respuesta, cuya variación depende exclusivamente de la concentración de calcio. Este método permite evaluar la fisiología a distintos niveles de síntesis y secreción de parathormona. El estudio histológico mostró positividad para inmunohistoquímica en las cuatro muestras, integridad histológica con H-E después de seis meses de criopreservación. El método desarrollado demostró ser un método sencillo, reproducible y práctico que permite evaluar la funcionalidad del tejido glandular tanto en cuanto a su viabilidad como a su funcionalidad. Este método puede ser usado como una herramienta mas a la hora de evaluar el tejido paratiroideo pre trasplante. Se requiere continuar los estudios con mayor número de muestras para poder estandarizar y fijar un valor de corte que nos permita tomar decisiones a la hora de reimplantar el tejido en los pacientes.

894. (7731) RELACIÓN ENTRE ESTRÉS OXIDATIVO Y ACTIVIDAD TELOMERASA. MILER, ELIANA; DOMINGUEZ, GABRIELA; BURDMAN, JOSÉ A.; RÍOS, MA DEL CARMEN; GUERRA, LILIANA N.

Depto Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; Escuela ORT Argentina, Hospital Israelita EZRAH

En el Servicio de Endocrinología estudiamos la validez de actividad de telomerasa como marcador de malignidad y/o pronóstico en cáncer. En SAIC 2003 realizamos una presentación sobre su importancia en cáncer de tiroides. Actualmente evaluamos la modificación de la actividad telomerasa por inducción de estrés oxidativo con drogas que se utilizan en el tratamiento del cáncer de mama. Por ello, tratamos la línea de carcinoma de mama T47D con dosis de $10\ \mu\text{M}$ de Tamoxifeno (TAM10), $20\ \mu\text{M}$ de tamoxifeno (TAM20) y $12\ \mu\text{M}$ de taxol (TX) y determinamos: actividad de glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD) y telomerasa y, niveles de malondialdehído (MDA). GPx aumentó significativamente con los tratamientos (vehículo: $29 \pm 5.6\ \mu\text{U/mg prot}$, TAM10: $81.50 \pm 3.54\ \mu\text{U/mg prot}$, $p < 0.01$ respecto de vehículo y TX: $115.5 \pm 11.7\ \mu\text{U/mg prot}$, $p < 0.01$ respecto de vehículo). SOD también aumentó con ambos tratamientos (vehículo: $1.99\ \text{U/mg prot}$, TAM10: $2.96\ \text{U/mg prot}$, TAM20: $4.28\ \text{U/mg prot}$, TX: $2.44\ \text{U/mg prot}$). Datos preliminares indican que solamente TAM10 indujo un importante aumento de los niveles de MDA (vehículo: $0.11\ \text{nmol MDA/mg prot}$, TAM10: $0.50\ \text{nmol MDA/mg prot}$). Mediante un ensayo TRAP cuantitativo determinamos la actividad telomerasa de T47D (actividad telomerasa relativa: 321). El tratamiento TAM10 disminuye en un 50% la actividad de telomerasa comparada con células tratadas con vehículo. El uso de la telomerasa como marcador pronóstico está siendo comprobado en el Servicio con muestras de pacientes con cáncer de mama que son tratadas con estas drogas. Si bien los tratamientos realizados provocan aumento de la actividad SOD y GPx; esto no sería suficiente para evitar el daño oxidativo, conduciendo a un aumento de la peroxidación lipídica en la línea celular T47D. En concordancia a lo observado por otros autores para otros sistemas, mostramos que el tamoxifeno actuaría como inductor de estrés oxidativo. La disminución de la actividad telomerasa podría ser consecuencia de dicho estrés.

895. (7735) RELACIÓN ENTRE HORMONA TIROIDEA Y APOPTOSIS. MILER, ELIANA; DOMINGUEZ, GABRIELA;

BURDMAN, JOSÉ A.; RÍOS, MA DEL CARMEN; GUERRA, LILIANA N.

Depto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; Escuela ORT Argentina, Hospital Israelita EZRAH

Hemos mostrado que tratamientos combinados de metimazol y mezcla antioxidante (que contiene vitamina C) mejora bioquímica y clínicamente a pacientes hipertiroides. Datos presentados en SAIC 2003 indicaron que dosis mayores de $20\ \text{nM}$ de T3 inducen estrés oxidativo en un modelo in vitro (línea celular Hep-2). En este trabajo evaluamos el efecto de T3 sobre la proliferación celular y apoptosis en Hep-2. Dosis de $20\ \text{nM}$ a $400\ \text{nM}$ de T3 y/o de $100\ \text{mg/l}$ de vitamina C (VC) fueron incluidas en el cultivo por 24 ó 48 horas. Se realizaron controles en ausencia de hormona. $200\ \text{nM}$ de T3 provoca disminución de la proliferación celular a las 24hs (control: $1520000 \pm 8370\ \text{cél/placa}$, T3: $730000 \pm 5920\ \text{cél/placa}$, $p < 0.01$). La VC revierte este efecto a las 48 hs (T3: $1020000 \pm 7100\ \text{cél/placa}$, T3+VC: $1380000 \pm 5615\ \text{cél/placa}$, $p < 0.01$). Dosis menores de $200\ \text{nM}$ de T3 no muestran diferencias significativas respecto al control. Para evaluar apoptosis realizamos ensayos con reactivo de Hoechst o con naranja de acridina, para el último cuantificamos el número de células apoptóticas en relación al total de células. Según el análisis estadístico de Tukey ($\alpha = 0.01$), $200\ \text{nM}$ de T3 indujo un porcentaje de células apoptóticas significativamente mayor, respecto del control (control: 4%, T3: 20%). VC disminuyó el número de células apoptóticas (T3+VC: 13%, sin diferencias significativas con el control); dosis menores a $200\ \text{nM}$ de T3 no provocaron apoptosis. T3 indujo la expresión de la proteína Erk1,2 a dosis de: $200\ \text{nM}$ (10% de núcleos teñidos) y $400\ \text{nM}$ (65 % de núcleos teñidos). En base a estos resultados demostramos un efecto directo de la hormona T3 sobre la proliferación celular y posible inducción de apoptosis. Los datos muestran que este efecto se revierte en presencia de vitamina C. La expresión de Erk 1,2 es inducida cuando las células son tratadas con la hormona, aunque el mecanismo por el cual la T3 influye en la cascada de las MAP kinasas no es claro. La apoptosis podría ser consecuencia del daño oxidativo provocado por altas concentraciones de la hormona.

896. (7863) CAMBIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS MORFOMÉTRICOS EN LA POBLACIÓN TIROTROPA CON INMUNONEUTRALIZACIÓN DE LA TIMULINA SÉRICA DURANTE LA VIDA TEMPRANA DE RATONES. CAMIHORT, GISELA¹; LUNA, GEORGINA^{1,2}; FERESÉ, CELIA²; GOYA, RODOLFO³; CONSOLE, GLORIA^{1,2}

(1) Cátedra B de Histología-Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP; (2) CICBA, INIBIOLP

La secreción de hormona tímica timulina está modulada mediante el sistema neuroendocrino, sugiriéndose la existencia de un eje timo-pituitario. Las hormonas tiroideas ejercen un efecto estimulador sobre las células epiteliales tímicas en cultivo, aumentando la secreción de timulina. La inmunoneutralización de la timulina sérica pretende explorar la hipótesis de que la timulina participa en dicho eje. Se investigaron los cambios inmunohistoquímicos morfométricos en la población tirotropa. Ratones hembras y machos C57BL/6 fueron inyectados con suero normal de conejo (SNC) o con antisuero anti-timulina (AAT) ($12\ \mu\text{l/g}$, vía i.p.) en los días 2, 3, 7, 14, 21 y 29 de vida postnatal. A los 33 días fueron sacrificados, obteniéndose las pituitarias que fueron procesadas para microscopía de luz y muestras séricas para la determinación de timulina mediante RIA, 10 días: pre-tratamiento 288 ± 81 ; post-tratamiento $24 \pm 20\ \text{fg/ml}$ y bioensayo de rosetas. Se inmunomarcó con un sistema anti-TSH-EnVision (Dako)-DAB. Se registraron los parámetros morfológicos mediante videomicroscopía: densidad de volumen (DV), densidad de células (DC) y tamaño celular (TC). Se hallaron cambios significativos en machos tratados (AAT) respecto a controles (SNC), en DV ($p = 0.0001$) y TC ($p = 0.0005$).

	Hembras	Hembras	Machos	Machos
TSH	SNC	AAT	SNC	AAT
DV ($\times 10^{-2}$)	5.8 \pm 0.9	4.7 \pm 0.6	6.1 \pm 1.9	13.2 \pm 0.7 *
DC ($\times 10^{-4}$)	9.0 \pm 0.7	9.4 \pm 0.6	11.8 \pm 2	12.6 \pm 1
TC (μm^2)	54.4 \pm 10	50.8 \pm 4.6	52.6 \pm 5	105.5 \pm 6 *

Concluyendo, los presentes resultados detectan una hipertrofia compensadora de la población tirotrópica en macho, avalando la existencia de un circuito tímico-pituitario-tiroideo.

ENDOCRINOLOGÍA 6

- 897. (6529) ACTH ESTIMULA LA LIBERACIÓN DE CORTICOSTERONA VÍA ÓXIDO NÍTRICO Y PROSTAGLANDINAS.** MOHN, CLAUDIA ESTER; FERNANDEZ-SOLARI, JAVIER; DE LAURENTIIS, ANDREA; DE LA CAL, CAROLINA; PRESTIFILIPPO, JUAN PABLO; LENZ, IVONNE; MCCANN, SAMUEL M; RETTORI, VALERIA
CEFYBO

Es bien conocido que ACTH aumenta AMPc y estimula la secreción de corticosterona (B) por la glándula adrenal (GA). En trabajos previos demostramos que el óxido nítrico (NO), incrementa la producción de PGE[2] y a través de ésta estimula la liberación de B. Nuestro objetivo fue estudiar si NO participa en la secreción de B estimulada por ACTH. Para ello GA de ratas macho Wistar (n=8-10/grupo) fueron incubadas «in vitro» en las siguientes condiciones: Buffer Krebs Ringer= control, ACTH 10(-8)M y 10(-9)M, ACTH en presencia de un inhibidor de la NOS (L-NAME 10(-3)M), un inhibidor de la COX (indometacina 10(-3)M) y Hemoglobina (Hb 40µg/ml). Se estudió el efecto de Forskolina (FSK 76µM), monobutiril AMPc 10(-4)M, (mbAMPc) análogo de AMPc, y diferentes concentraciones de PGE[2] sobre la secreción de B. Se midió la liberación de B en el medio de incubación y el contenido de AMPc en la GA por RIA. Los resultados se analizaron por ANOVA y test de Newman-Keul's, * = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001. ACTH estimuló la liberación de B en las diferentes concentraciones usadas (C: 30 \pm 2.0 ng/mg prot, ACTH 10(-8)M: 43.6 \pm 8.0* y 10(-9)M: 46.6 \pm 4.6**), L-NAME y Hb bloquearon el estímulo de ACTH 10(-9)M (ACTH+L-NAME: 28.6 \pm 2.7 ng/mg prot***; ACTH+Hb: 28.2 \pm 3.5**). FSK y mbAMPc no tuvieron efecto sobre la liberación de B con respecto al control. El contenido de AMPc (C: 343.7 \pm 13.8 fmol/mg prot) fue aumentado tanto por ACTH 10(-9)M (409.2 \pm 16 **) como por FSK (997 \pm 229***). PGE[2] estimuló la liberación de B (C: 38.8 \pm 3 ng/mg prot.; PGE 10(-7)M 66.8 \pm 5**) e indometacina bloqueó el estímulo de ACTH (ACTH 10(-9)M 46.6 \pm 4.6 ng/mg prot v.s Indo+ACTH 22.4 \pm 3.7**) sobre la secreción de B. En la vía de liberación rápida de B estimulada por ACTH participan NO y las prostaglandinas. ACTH activa la NOS y el NO liberado activaría la COX. El aumento de prostaglandinas estimularía la liberación de B independientemente del aumento en el contenido de AMPc en la GA

- 898. (6749) ESTIMULACION DEL EJE GONADAL DURANTE LA MADURACION SEXUAL EN RATAS MACHO PROVOCADA POR LEPTINA. PAPEL DEL SISTEMA AMINOACÍDICO HIPOTALÁMICO.** PONZO, OSVALDO; REYNOSO, ROXANA; CAROU, ELENA; SZWARCFARB, BERTA; CARBONE, SILVIA; MOGUILLEVSKY, JAIME; SCACCHI, PABLO

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

Hemos demostrado anteriormente que la leptina activa el eje gonadal en ratas hembra pre y peripuberes, y lo inhibe en machos adultos. Esta acción se lleva a cabo a nivel hipotalámico modificando la secreción de GnRH y sus neuromoduladores. Objetivo: estudiar el efecto de la leptina sobre la regulación neuroendocrina del eje gonadal en ratas macho prepúberes de

15 días (E15) y peripuberes de 30 días (E30). Métodos: Se utilizaron ratas Wistar macho de 15 y 30 días de edad, a las cuales se les administró leptina (ip) a una dosis de 30 µg/kg, 60 minutos antes del sacrificio. En el plasma obtenido se determinó LH por RIA. Los hipotálamos se disecaron inmediatamente luego del sacrificio y se incubaron en medio de Earle's durante 60 minutos, previa preincubación de 20 minutos. En el sobrenadante obtenido se determinó GnRH por RIA y aminoácidos (glutamato, aspartato y GABA) por HPLC-UV. Los datos fueron analizados por test «t» de Student y se considera p<0.05 como significativo. Resultados: la leptina incrementó la concentración de LH plasmática (p<0.01) [E15: Control (C)= 6.6 \pm 0.62, Leptina (L)= 24.93 \pm 9.3; E30: C= 4.3 \pm 0.28, L= 33.02 \pm 3.99 ng/ml] y la liberación hipotalámica de GnRH (p<0.01) [E15: C=0.077 \pm 0.0128, L= 0.171 \pm 0.0227; E30: C= 0.111 \pm 0.017, L= 0.259 \pm 0.037 pg/ml/mg tejido fresco]. También se incrementó (p<0.01) la liberación de glutamato hipotalámico [E15: C=188.7 \pm 7.8, L= 534.7 \pm 59.8; E30: C= 321 \pm 47.8, L= 543 \pm 23.0 pmol/100µl], mientras que el aspartato aumentó (p<0.01) sólo en E30: C= 935.1 \pm 269.5, L= 3184 \pm 156.5 pmol/100µl]. La secreción de GABA permaneció inalterada. Conclusión: la leptina estimula el eje gonadal en ratas macho pre y peripuberes, actuando sobre niveles hipotalámicos neuroendocrinos (LH y GnRH). Los aminoácidos excitatorios estarían involucrados en esta acción.

- 899. (6753) REGULACION DE LA PRODUCCIÓN DE LACTATO Y DE LA INCORPORACIÓN DE GLUCOSA EN TUBOS SEMINÍFEROS HUMANOS.** PELLIZZARI, ELIANA H; MERONI, SILVINA; GALARDO, MARÍA NOEL LUJÁN; RIERA, MARÍA FERNANDA; CIGORRAGA, SELVA B

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE)

Demostremos previamente que FSH e IGF-I regulan la incorporación de glucosa y la producción de lactato en células de Sertoli (CS) de rata. El objetivo del trabajo fue evaluar si mecanismos semejantes están presentes en tubos seminíferos (TS) humanos. Se cultivaron TS provenientes de un paciente de 13 años de edad con pseudohermafroditismo masculino. Los cultivos se estimularon con FSH (100ng/ml), dbAMPc (1mM) e IGF-I (50ng/ml) en presencia o ausencia de Wortmanina (W, inhibidor de fosfatidil-inositol-3 quinasa [PI3K], 0,1 µM). La incorporación de 2-deoxiglucosa tritiada (2-DOG) se determinó en TS estimulados por una hora y la producción de lactato en medios condicionados de 48 horas con idénticos tratamientos. FSH, dbAMPc e IGF-I estimularon la incorporación de 2-DOG y la producción de lactato. La adición de W inhibió el efecto estimulador de FSH, dbAMPc e IGF-I sobre la incorporación de 2-DOG (basal: 1382 \pm 131a; FSH: 1722 \pm 18b; dbAMPc: 1667 \pm 100b; IGF-I: 1884 \pm 90b; FSH+W: 1228 \pm 79a; dbAMPc+W: 1284 \pm 58a; IGF-I+W: 1330 \pm 35a dpm/µgADN) y el efecto de FSH y dbAMPc sobre la producción de lactato (basal: 42.1 \pm 0.5a; FSH: 56.6 \pm 2.1b; dbAMPc: 76.8 \pm 2.6c; IGF-I: 58.2 \pm 2.6b; FSH+W: 41.6 \pm 2.7a; dbAMPc+W: 64.5 \pm 3.2d; IGF-I+W: 56.8 \pm 2.4b µg/µgADN). Los resultados se expresan como media \pm DS de incubaciones realizadas por triplicado, (distintas letras indican grupos con diferencias significativas, p<0.05). Los datos obtenidos sugieren que, al igual que en CS de rata, una vía PI3K dependiente es esencial para la incorporación de glucosa independientemente del estímulo utilizado. Por otra parte, una vía PI3K parecería participar en la regulación de la producción de lactato estimulada por FSH.

- 900. (6804) DIFERENCIAS SEXUALES EN RATAS: EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO Y EMOCIONAL SOBRE EL SISTEMA SIMPÁTICO E ÍNDICES DE ANSIEDAD.** RENARD, GEORGINA M. (1); SUÁREZ, MARTA M. (1); LEVIN, GLORIA (2); RIVAROLA, M. ANGÉLICA (1)

(1) Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Cs. Exactas, Físicas y Naturales, UNCórdoba. (2) CEDIE-CONICET, Hosp. de Niños R. Gutiérrez - Bs. As.

Existen evidencias de que manipulaciones ambientales durante el desarrollo temprano pueden inducir alteraciones perma-

nentes en el comportamiento emocional y la maduración del sistema simpático en ratas. El objetivo de este trabajo es estudiar los efectos a largo plazo de la separación materna temprana (SM) y el estrés variable impredecible sobre la actividad médula adrenal y la génesis de la ansiedad en ratas macho y hembra. Los animales fueron privados de su madre diariamente por 4.5 hs. durante las tres primeras semanas de vida. A los 48 días de edad fueron sometidos a estrés crónico impredecible (5 estresores distintos durante 24 días). Los índices de ansiedad se midieron por medio del test de laberinto en cruz elevada (plus maze) el día previo al sacrificio. La separación materna produjo, en hembras, un aumento en los niveles de Adrenalina (A) y Noradrenalina (NA) aunque no fue estadísticamente significativo. El estrés impredecible no alteró los niveles de catecolaminas plasmáticas ni en machos ni en hembras. Sin embargo, los machos sometidos al test de ansiedad mostraron niveles aumentados de estas hormonas $p < 0.001$. En hembras separadas de la madre y estresadas se observó un incremento en la NA plasmática $p < 0.05$. Por otro lado, las ratas macho criadas con la madre, privadas de la madre y estresadas, sometidos al test de ansiedad mostraron niveles elevados de catecolaminas comparados con las hembras $p < 0.001$. La exposición al estrés crónico produjo en hembras una disminución en la ansiedad $p < 0.01$. Ansiedad que también disminuyó cuando se las separó de la madre y estresó al compararlas con los machos $P < 0.01$. Estos resultados indican que la privación materna temprana y el estrés causan alteraciones a largo plazo dependientes del sexo en la respuesta simpática y en los índices de ansiedad de ratas adultas, y en particular producen menor reactividad emocional en ratas hembras.

901. (6828) RELACION ENTRE NIVELES SERICOS DE DEHIDROEPIANDROSTERONA-SULFATO (DHEAS), SISTEMA GH-IGF-1 Y SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN NIÑAS CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGENITA (CAH) BAJO TERAPIA CORTICOIDEA. GUERCIO, GABRIELA VIVIANA; RIVAROLA, MARCO A.; CHALER, EDUARDO; MACEIRAS, MERCEDES; BELGOROSKY, ALICIA

Servicio Endocrinología. Hospital de Pediatría Garrahan

Las hormonas sexuales modulan el sistema GH-IGF-1, la insulinosensibilidad (SI) y la diferenciación adiposa. Nuestra hipótesis es que la inhibición del DHEAS al momento de la adrenarca podría afectar esta modulación. Objetivo: analizar la interacción entre el sistema GH-IGF-1, SI y DHEAS en niñas con CAH bajo terapia corticoidea (GC) Se estudiaron 56 niñas con CAH: 20 prepuberes (CAHPp, edad cronológica, EC: $6.31 \pm 2.4a$) y 36 púberes (CAHPu: 21Pu tempranas [CAHEPu] EC: $8.64 \pm 1.87a$, y 15 Pu tardías [CAHLPu] EC: $11.28 \pm 1.23a$) Fueron subdivididas (1 y 2) según posean una respuesta adecuada o inadecuada a la misma dosis de GC (< 20 mg/m²/día) resp., evaluada según los niveles sericos de androstenediona (A) y testosterona (T) acordes al sexo y edad. Todos los grupos tenían controles normales apropiados al desarrollo sexual (C). Se evaluaron los niveles sericos de IGF-1, IGFBP-3; DHEAS, A, T, Índice Glucemia/Insulina en ayunas (G/I), como medida de SI, y el BMI. Resultados: En CAHPp1 G/I fue sig. menor que en HSCPp2 y CPp, $p = 0.03$, incluso para similar BMI. Los niveles de DHEAS fueron sig. menores y los niveles de IGF-1, pero no los de IGFBP-3, fueron sig. mayores en los grupos tratados en relación con los C ($p < 0.05$), excepto para HSCPp2. Matriz de Pearson mostró una correlación negativa sig. entre G/I y EC y entre G/I e IGF-1, y una correlación positiva sig. entre G/I y $\%A$, G/I y T y entre G/I y DHEAS en CAHPp. En CAHLPu solo se halló una correlación negativa sig. entre G/I e IGF-1. En niñas Pp y Pu con CAH tratadas con GC, la inhibición de DHEAS está asociada con un incremento en el IGF-1 sérico, pero no IGFBP-3, y una disminución en la SI durante la prepubertad, sugiriendo una alteración en la respuesta biológica en ambos casos. Estos hallazgos podrían estar relacionados al deterioro en la talla final reportado en algunos pacientes con CAH aun bajo un adecuado tratamiento con GC.

902. (6973) CORTISOL Y ALDOSTERONA EN SALIVA EN RESPUESTA A BAJA DOSIS DE ACTH EN PACIENTES INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH). PERSI, G; CARDOSO, E; GONZALEZ, N; ARREGGER, A; BURGOS, M(1); RODRIGUEZ, V(1); MOLINA, A (1); TUMILASCI, O(2); CONTRERAS, L

Departamento de Endocrinología Experimental, IDIM A. Lanari, UBA-CONICET; 1 Infectología, Hosp. Tornú; 2 Lab. Gl. Salivales, Medicina, UBA

Recientes estudios demuestran alteración de la esteroidogénesis adrenal en pacientes asintomáticos infectados con VIH. Basados en estos antecedentes estudiamos la función adrenal en respuesta a baja dosis de ACTH en 21 pacientes VIH asintomáticos clasificados según CDC en categoría: A1: 4, A2: 7, A3: 2, B2:1, C1:1, C2: 5, C3:1, libres de medicación que afectara la función adrenocortical. El grupo control (C) estuvo constituido por 21 voluntarios sanos. A las 8,0 hs luego de la obtención de una muestra basal de saliva entera, se inyectaron 25 µg de ACTH sintética en el deltoides obteniéndose muestras de saliva a los 15, 30, 45 y 60 minutos post estímulo para la determinación de cortisol (SAF) y aldosterona (SAL) por RIA. Las concentraciones basales de SAF (media \pm DS) de VIH fueron similares a las de C ($11,4 \pm 4,5$ y $8,9 \pm 5,0$ nmol/L, respectivamente; $p = 0,074$). En C a los 30 minutos post estímulo se obtuvo la máxima concentración de SAF ($39,5 \pm 15,2$; rango = $20,0-70,0$ nmol/L), definiéndose respuesta normal a un valor de SAF igual o superior a 20,0 nmol/L. Un paciente VIH demostró respuesta subnormal de SAF (18,0 nmol/L). Las concentraciones basales de SAL de VIH ($32,0 \pm 36,9$ pmol/L) no fueron diferentes a C ($36,5 \pm 20,6$ pmol/L, rango: 13,0-63,0; $p = 0,146$). Un paciente VIH presentó SAL basal = 180,0 pmol/L, superando el rango definido para C. En C la respuesta máxima de SAL se obtuvo a los 30 minutos post ACTH ($171,0 \pm 71,0$; rango = $100,0-340,0$ pmol/L), definiéndose respuesta normal a un valor de SAL igual o superior a 100,0 pmol/L. En 7 pacientes VIH la concentración de SAL a los 30 minutos fue menor a 100,0 pmol/L ($59,8 \pm 31,0$, rango = $13,5-90,0$ pmol/L). La evaluación adrenal en respuesta a la administración de baja dosis de ACTH en pacientes VIH evidenció trastornos de la esteroidogénesis en el 38% de los casos estudiados.

903. (7077) DISMINUCIÓN EN LA EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE LAS ACTIVIDADES NPY Y OB-RB EN UN MODELO DE HIPERLEPTINEMIA CRÓNICA. MORENO, GRISELDA(1); SPINEDI, EDUARDO

Lab. de Neuroendocrinología. IMBICE, Laboratorio de Neuroendocrinología. IMBICE La Plata. (1) Becaria CIC.

El hipotálamo es una estructura relevante para la integración de señales que regulan la homeostasis del individuo. Entre los sistemas más importantes reguladores del apetito se destacan el NPY-érgico y el de señalización de leptina, orexigénico y anorexigénico respectivamente. Las neuronas localizadas en el núcleo arcuato hipotalámico (NA) son el blanco principal de la leptina, y se ha establecido que la señal de glucocorticoides interviene en el circuito regulador del apetito. El tratamiento neonatal con L-glutamato monosódico (MSG) induce el daño del NA, generando animales que desarrollan hipofagia, hiperadiposidad, hiperleptinemia, y otras anomalías. El objetivo de este trabajo fue determinar, en el modelo MSG, cómo se encuentran expresados a nivel hipotalámico los ARNm de neuropéptido Y (NPY) y de los receptores para leptina (Ob-Rb) y glucocorticoide (RG). Para este fin, se realizaron extracciones de ARN total de tejido hipotalámico procedente de ratas hembra adultas control (CTR) y MSG. Por la técnica de RT-PCR se amplificaron los ARNm de Ob-Rb y NPYm a 54°, y el de RG a 55°; la amplificación del ARNm de b-actina se utilizó para realizar la semicuantificación. Las expresiones hipotalámicas de NPY y Ob-Rb fueron significativamente menores en tejidos de ratas MSG que en los de CTR, según las relaciones a b-Actina (en unidades arbitrarias; $0,54 \pm 0,09$ vs. $0,945 \pm 0,09$, $p < 0,05$; y $0,65 \pm 0,04$ vs. $0,77 \pm 0,05$, $p < 0,05$, respectivamente). Contrariamente, no encontramos diferencias significa-

tivas en la expresión de GR. Nuestro trabajo demuestra que en el modelo MSG se encuentran disminuidas las vías NPY-érgica y del sistema de señalización de leptina, resultados que avalan la destrucción neurotóxica del NA, y que podrían explicar, al menos en parte, la hipofagia y la resistencia hipotalámica a la leptina. Si bien no encontramos modificaciones en la expresión de RG hipotalámico, no descartamos cambios funcionales en este sistema de señalización. Subvencionado por PICT 5-5191/99.

904. (7201) EFECTOS DEL LIPOPOLISACÁRIDO A NIVEL HIPOTALÁMICO Y SU INFLUENCIA SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE LEPTINA DURANTE LA MADURACIÓN SEXUAL. REYNOSO, ROXANA; BOLLERO, GABRIELA; MOHN, CLAUDIA; SZWARCFARB, BERTA; CARBONE, SILVIA; PONZO, OSVALDO; MOGUILVSKY, JAIME; SCACCHI, PABLO

Laboratorio de Endocrinología.Dto.de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA

La activación del sistema inmune, es a menudo acompañada por alteraciones en el eje reproductor. En el presente trabajo estudiamos el efecto de la administración de una dosis única de LPS (250 ug/kg, i.p) sobre la actividad de NOS (isoformas iNOS y cNOS), contenido de Gn-RH, ácido glutámico (GLU) y GABA, en homogenatos de APO-HMB, de ratas hembra, (n=10-12/grupo) de 15 y 30 días, (pre y peripúberes), y sobre los niveles séricos de leptina. Los animales fueron inyectados a las 9.00 hs y sacrificados a las 5 horas post administración. LPS no produjo modificaciones significativas en ninguno de los parámetros estudiados en prepúberes. En peripúberes, LPS incrementó significativamente la actividad iNOS, (Método de 14C Arg, pmoles NO/10 min/HMB), (0.18 ± 0.01 vs 0.22 ± 0.02 , $p < 0.001$), cNOS (3.6 ± 0.2 vs 5.3 ± 0.3 , $p < 0.001$) y el contenido de Gn-RH (RIA, pg/mg de tejido), (1.95 ± 0.1 vs 3.1 ± 0.3 , $p < 0.001$), disminuyó el de GABA, (HPLC, nmoles/mg prot.), (17.0 ± 0.9 vs 5.0 ± 0.5 , $p < 0.0001$) y no modificó el de GLU. La leptinemia (ELISA, ng/ml) disminuyó significativamente con el tratamiento, (0.96 ± 0.04 vs 0.25 ± 0.01 , $p < 0.0001$). La falta de efecto de LPS en animales prepúberes, podría estar dado por una inmadurez en los mecanismos neuroinmunomoduladores. En peripúberes, es probable que el mecanismo de respuesta inicial al LPS esté mediado por el aumento de cNOS, con inducción posterior de iNOS, la cual sintetizaría cantidades masivas de NO, que como es conocido reduce sus efectos liberadores sobre Gn-RH. Este mecanismo y la disminución del contenido de GABA (aminoácido inhibitorio de la secreción de Gn-RH), podrían ser responsables de la disminución de la liberación de Gn-RH, con el consecuente aumento de su contenido. El descenso de leptina podría relacionarse con el efecto inhibitorio alfa adrenérgico que controla su secreción, probablemente exacerbado por la dosis de LPS administrada.

905. (7493) EFECTO DE GHRELINA SOBRE LA PRODUCCIÓN ADIPOCITARIA DE LEPTINA. GIOVAMBATTISTA, A.; PIERMARÍA, J.; SUESCUN, M.O.; CALANDRA, R.S.; SPINEDI, E.

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, La Plata

Ghrelina (Ghr), péptido generado principalmente por el estómago, es un importante factor orexigénico que controla el balance energético del organismo. Existen limitadas evidencias acerca del rol de esta hormona sobre la fisiología del tejido graso. El objetivo del presente trabajo fue evaluar «in vitro» si Ghr afecta la producción adipocitaria de leptina (Lep). A partir de tejido graso retroperitoneal, de ratas macho Sprague-Dawley adultas, se aislaron adipocitos y se evaluó la acción de Ghr (0,1 nM) sobre la liberación de Lep a las 0,5, 12, 24 y 48 horas de incubado. A todos los tiempos estudiados, Ghr incrementó significativamente la secreción de Lep con respecto al basal ($p < 0,05$). Se estudió también el efecto de diferentes concentraciones de Ghr (0,001-1 nM) a las 24 horas de cultivo. Si bien Ghr 0,001 nM no mostró un efecto significativo, las tres concentraciones mayores de Ghr

aumentaron la liberación de Lep en el medio: Basal: $3,86 \pm 0,30$; Ghr 0,01 nM: $4,94 \pm 0,61$; Ghr 0,1 nM: $6,59 \pm 0,65$ y Ghr 1nM: $7,24 \pm 0,73$ ng de Lep/ml de medio; $p < 0,05$ vs. Basal). Con el fin de evaluar los efectos de Ghr 0,1 nM sobre la expresión de Ob, se aisló ARN a partir de adipocitos y se semicuantificó por RT-PCR. Se observó que Ghr 0,1nM aumentó significativamente la expresión del ARNm de Lep con respecto al Basal ($p < 0,05$). Finalmente, estudiamos si los efectos de Ghr son ejercidos a través del receptor GHRa1, para ello se co-incubó Ghr 0,1 nM con diferentes concentraciones de D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11-sustancia-P (10-1.000 nM, antagonista de GHRa1, A-Ghr). La presencia de A-Ghr (100 y 1.000 nM) bloqueó los incrementos en la liberación y en la expresión de ARNm de Lep inducidos por Ghr 0,1 nM. En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio permiten concluir que: a) Ghr es un factor estimulante de la liberación adipocitaria de Lep, así como de la expresión de su mensajero; y b) los efectos de Ghr sobre las células adiposas estarían mediados por el receptor específico GHRa1. (Financiada por Beca Carrillo-Oñativia).

906. (7649) INDUCCION DE HEMO OXIGENASA POR ACTH: ESTRÉS OXIDATIVO Y MODULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS. POMERANIEC, YAEL; PANNUNZIO, VANESA; PIGNATARO, OMAR; CYMERYNG, CORA B

Departamento de Bioquímica Humana - Facultad de Medicina - UBA; IByME - CONICET

La enzima hemo oxigenasa (HO) cataliza el clivaje oxidativo del hemo produciendo de biliverdina y monóxido de carbono (CO) y liberación de hierro. La biliverdina es convertida en bilirrubina, un potente antioxidante. En ese sentido, se ha incluido a la HO en los mecanismos de defensa celular contra el estrés oxidativo. Por otro lado, es conocida la función del CO como modulador de la actividad de diversas hemoproteínas. En trabajos previos demostramos la inducción de HO-1 por la hormona ACTH en células adrenales. El objetivo del trabajo es evaluar si dicha inducción responde a un aumento del estrés oxidativo celular y estudiar la participación de la actividad HO en la modulación de la esteroidogénesis adrenal. Las células Y1 (línea celular adrenocortical de ratón) se incubaron con ACTH y se determinaron especies reactivas del oxígeno (ROS) utilizando el reactivo fluorescente 2',7'diclorodihidrofluoresceína diacetato. Los niveles de ROS aumentaron significativamente desde 1 h de incubación (C: $105,8 \pm 5,5$; ACTH 1h: $159,2 \pm 17,2$; $p < 0,01$; ACTH 2 h: $163,8 \pm 12,7$ $p < 0,01$; ACTH 3 h: $155,52 \pm 6,3$ $p < 0,05$). No se observó incremento en los niveles de ROS cuando la incubación se hizo en presencia de bilirrubina o de melatonina, dos antioxidantes conocidos. La incubación de las células con bilirrubina o melatonina bloqueó el efecto inductor de ACTH a nivel del ARNm para HO-1. Para evaluar la participación de HO en la modulación de la esteroidogénesis, las células se incubaron con CoCl₂ (inductor de HO-1) y luego se estimularon con ACTH con o sin Sn-PPIX (Sn-P). El CoCl₂ no afectó significativamente la esteroidogénesis estimulada por ACTH mientras el Sn-P la incrementó significativamente (en ng/mg prot ACTH: $0,14 \pm 0,01$, ACTH + Co₂: $0,085 \pm 0,03$; ACTH + Co₂ + Sn-P: $0,37 \pm 0,07$; $p < 0,001$). La inducción de HO-1 por ACTH sería mediada por el incremento en los niveles de ROS. Por otra parte, el CO producido actuaría como modulador negativo de la esteroidogénesis.

907. (7922) EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA HEMOXIGENASA (HO) SOBRE EL SISTEMA DE OXIDO NITRICO SINTASA (NOS) Y LA PRODUCCIÓN DE CORTICOSTERONA (CA) EN GLÁNDULA ADRENAL DE RATA. CYMERYNG, CORA BEATRIZ; POMERANIEC, YAEL; VANESA, PANNUNZIO; REPETTO, MARTIN; MARTÍNEZ CALEJMAN, CAMILA; TESLER, LEONEL; KREPLAK, NICOLÁS; PONCE, RAQUEL; ARIAS, PABLO

DEPTO DE BIOQUIMICA HUMANA, FMED-UBA; DEPTO DE FISILOGIA, FMED-UBA

Dadas las similitudes entre los sistemas nitrérgico y de generación de CO y teniendo en cuenta el efecto de la NOS sobre

la función del eje hipotálamo-hipofísio-adrenal nos planteamos estudiar el efecto de la inhibición «in vivo» de la HO sobre la actividad de NOS y sobre la esteroidogénesis adrenal. Ratas Wistar macho (280-320 g) implantadas con cánulas yugulares fueron tratadas con Sn-PPIX (40 mg/kg s.c.) o vehículo a las 10 p.m. La mitad de ellas recibió ACTH (3,75 UI i.v.) 12 horas después. Se les extrajo sangre (300 µl) a través de la cánula a intervalos fijos y fueron sacrificadas a las 16 hs de la inyección de Sn-PPIX (2 p.m.) obteniéndose muestras de hipotálamo mediobasal (MBH), adenohipofísis y corteza adrenal. La actividad de NOS adrenal disminuyó tras Sn-PPIX (13,0 ± 0,7 vs. 10,1 ± 0,3 pmol/min/mg; p<0,05), y aumentó a las 4 h de inyectar ACTH (p<0,05). El estímulo de ACTH fue potenciado por Sn-PPIX (16,4 ± 0,2 vs. 24,6 ± 1,3 pmol/min/mg; p<0,01). No hubo diferencias en los niveles plasmáticos no estimulados de CA entre animales controles y tratados con inhibidor, y la inyección de ACTH produjo un incremento marcado del nivel de CA, efecto atenuado por Sn-PPIX (292 ± 19 vs. 215 ± 13 ng/ml; p<0,05). El tratamiento con Sn-PPIX o con ACTH produjo una inhibición significativa en la actividad de NOS en MBH (CON: 31,6 ± 2,8; Sn-PPIX: 18,6 ± 1,9; ACTH: 15,9 ± 1,8 pmol/min/mg; p<0,01). Estos resultados sugieren una relación entre las actividades de HO y NOS en distintos niveles del eje. A fin de evitar efectos de tipo «todo o nada» la respuesta esteroidogénica adrenal a ACTH sería modulada negativamente por el NO. La inhibición de HO podría incrementar los niveles y actividad de NOS (por presencia de mayores niveles de hemoproteína). El NO producido inhibiría entonces la esteroidogénesis adrenal.

908. (7954) EFECTO DEL ÁCIDO VALPROICO SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN CÉLULAS ADRENOCOR-TICALES. BRION, LAURA; GOROSTIZAGA, ALEJANDRA; CORNEJO MACIEL, FABIANA; PODESTA, ERNESTO J.; PAZ, CRISTINA

Dpto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El tratamiento con ácido valproico (AV), una droga antiepiléptica, se asocia frecuentemente con desórdenes endócrinos. Estudios in vitro demuestran que el AV altera el patrón de secreción de esteroides e incrementa la expresión de varias enzimas esteroidogénicas en células de ovario de diferentes especies. Dado que algunas de estas enzimas catalizan reacciones que son comunes de la biosíntesis de todos los esteroides, nos propusimos investigar si el AV impacta sobre la biología de las células adrenocorticales. Analizamos el efecto del AV sobre la producción de progesterona (P4, 3 h), evaluada por radioinmunoensayo y expresada como ng de P4/ml, en células Y1. Determinamos que 1,5 mM de AV incrementa tanto la producción basal de P4 (C= 67 ± 8; AV= 85 ± 8, P < 0,1) como la sostenida por 22-R-OH-colesterol (22R-C) (22R-C= 128 ± 9; 22R-C + AV= 185 ± 12, P < 0,01). En contraste, la producción de P4 a partir de pregnenolona (P5) fue inhibida por AV (P5 = 312 ± 34; P5 + AV= 250 ± 13, P < 0,1). Una concentración menor de AV (0,75 mM), no afectó la producción de P4 en células Y1 luego de 3 horas de tratamiento. A nivel molecular determinamos que el AV incrementa rápidamente la actividad de las MAP quinasas ERK1/2 y JNK. Estos resultados indican que la adrenal es un potencial sitio de acción del AV, actuando sobre diferentes enzimas de la vía esteroidogénica. Como los efectos observados son tanto estimulatorios como inhibitorios, la consecuencia neta sobre la esteroidogénesis adrenocortical dependería del balance entre las acciones individuales.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS 2: PARASITOLÓGIA

909. (6891) TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA DEL RATÓN CON TRIFLURALÍN. LUONG, T (1,2); LIRUSSI, D (2); BLEIZ, J (1); DEL BUONO, B (1); QUIJANO, G (1); DRUT, R (1); KOZUBSKY, L (1); BUSCHIAZZO, H (2); ZAIDENBERG, A (1,3)

(1) Hospital de Niños de La Plata (2) Farmacología Fac Cs Médicas Unlp, (3) Cic Prov Bs As

El trifluralín (a,a,a-trifluoro-2,6 dinitro-N,N'-dipropil-p-toluidina) herbicida inhibidor microtubular fue utilizado como tratamiento en la enfermedad de Chagas crónica en ratón. 148 ratones albinos CF1 de 18 g se infectaron con trypomastigotes de T.cruzi clon H510C8C3. 100 ratones fueron tratados con Benznidazole (50 mg/kg/día) durante 10 días vía oral. 48 ratones no tratados (control) mueren al día 41 (100%). Al día 90 de la enfermedad crónica 74% de sobrevivida. Se trató a los ratones en tres grupos v/o durante 60 días: trifluralín (50mg/kg/día- 26 ratones), benznidazole (50mg/kg/día-25 ratones) y control (aceite de maní-23 ratones). Al inicio y al final del tratamiento se realizó electrocardiografía (previa anestesia con pentobarbital 30 mg/kg/dosis), serología de inmunofluorescencia y strout. Al día 10 posttratamiento se realiza sacrificio e histopatología cardíaca. Se observó una mortalidad espontánea de 30,43% del control, de 3,85% trifluralín y 4% benznidazole (sobrevivida significativa, p=0.01). Los strout fueron negativos en los tres grupos. La negativización de los títulos de inmunofluorescencia fue de 0% para el grupo control, del 16% para el trifluralín (p=0.05), y del 29% para el benznidazole (p<0.02). El trastorno electrocardiográfico dominante fue la prolongación del PR (35,41%, p=0.001), observado en los grupos control y benznidazole, en tanto que en el grupo trifluralín el intervalo PR no se alteró significativamente (p=0.52), lo que sugiere que el tratamiento con trifluralín mejora o detiene el daño que la enfermedad provoca en el sistema de conducción. Los grupos tratados con trifluralín y benznidazole mostraron lesiones histológicas similares, presentando en general focos de miocarditis pequeños y aislados. Estos resultados revelan el potencial terapéutico del trifluralín en la enfermedad de Chagas crónica.

910. (6939) EVOLUCIÓN DE LA AFINIDAD Y DENSIDAD DE LOS RECEPTORES BETA-CARDÍACOS EN MODELOS REINFECTADOS CON DIFERENTES CEPAS DE TRYPANOSOMA CRUZI. BUSTAMANTE, JUAN M; LO PRESTI, MARÍA S; RIVAROLA, HÉCTOR W; FERNÁNDEZ, ALICIA R; ENDERS, JULIO E; PAGLINI, PATRICIA A

Cátedra de Física Biomedica, Fac. de Ciencias Médicas, UNC. Santa Rosa 1085 CP:5000

La densidad y afinidad de los receptores beta-adrenérgicos cardíacos está disminuida en miocardiopatías tales como la isquémica crónica y la cardiomiopatía dilatada. Hemos demostrado que el modelo murino infectado con Trypanosoma cruzi presenta alteraciones similares. En el presente, se analizó, en ratones albinos suizos, el efecto de las reinfecciones en la afinidad y densidad de los receptores beta-cardíacos. Se infectaron ratones con 50 tripomastigotes de T. cruzi, cepa Tulahuen (Tul) y del aislamiento SGO-Z12 (SGO). Las reinfecciones se realizaron a los 10 y 20 días de la primera infección. Los grupos se designaron: Tul-I y SGO-I: infectados con cepa Tul (n=25) y SGO (n=25) respectivamente, Tul-R y SGO-R: reinfectados con cepa Tul (n=25) y SGO (n=25) respectivamente. Se midió la afinidad (Kd: nM) y densidad (Bmax: fmol/mg.prot) de los receptores por «binding» con dihidroalprenolol tritiado. La densidad en SGO-R mostró una disminución significativa con el avance de la infección (357,68±8,8 etapa aguda, 308,61±6,6 indeterminada y 278,03±9,8 crónica) con respecto a SGO-I, (p<0,01); un comportamiento similar se observó en Tul-R (257,02±6,2; 208,29±5,6 y 155,88±5,3) (p<0,01). Tul-I y SGO-I presentaron densidades similares hasta la etapa crónica momento en que disminuyó significativamente (p<0,01). En cambio, los grupos reinfectados mostraron densidades superiores en la etapa crónica (51% mayor para SGO-R y 300% para Tul-R) (p<0,01). La Kd disminuyó en todos los grupos (p<0,01). Las reinfecciones en el estadio crónico produjeron una disminución en la afinidad del 300% (p<0,01) en Tul-R, y del 18% en SGO-R. Estos resultados muestran que las reinfecciones y las cepas fueron determinantes para modificar la afinidad y densidad de los receptores beta-adrenérgicos cardíacos.

- 911. (6965) ETAPA INDETERMINADA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS: ALTERACION DE ALGUNOS ES LABONES DEL SISTEMA BETA-ADRENÉRGICO CARDIACO.** LO PRESTI, MARÍA S; BUSTAMANTE, JUAN M; RIVAROLA, HÉCTOR W; FERNÁNDEZ, ALICIA R; ENDERS, JULIO E; LEVIN, GLORIA (1); PAGLINI, PATRICIA A

Cátedra de Física Biomédica, Fac. de Ciencias Médicas, UNC. Santa Rosa 1085 CP: 5000 (1) CEDIE-CONICET Hosp. Niños R. Gutierrez, Gallo 1330, Bs As. CP: 1425.

La etapa indeterminada de la enfermedad de Chagas es considerada como un periodo largo y clínicamente silente sin embargo en el presente trabajo demostramos que en la transducción de señales del sistema beta-adrenérgico cardíaco se producen alteraciones que probablemente determinen la aparición de la miocardiopatía. Se estudió en ratones infectados con *T. cruzi*, cepa Tulahuen (n:60) a los 75 días post infección (fase indeterminada), adrenalina (A) y noradrenalina (NA) plasmáticas por HPLC-DE y en los corazones la afinidad y densidad de los receptores beta-cardíacos por «binding» con dihidroalprenolol tritiado la función de los mismos mediante curvas dosis-respuestas con A, los niveles de AMPc por ELISA y la contractilidad como respuesta final del sistema. Un grupo no infectado también fue estudiado (n: 39). Las catecolaminas (ng/ml) aumentaron con respecto al grupo no infectado (A: 5,21±1,16; NA: 12,18±0,66, p<0,05). La afinidad (Kd en mM) del grupo infectado fue de 6,86±0,21, valor significativamente inferior que los no infectados (3,61±0,05), p< 0,05 y la densidad (Bmax en fmol/mg prot) no se modificó (77,28±0,91 y 71,97±0,36 respectivamente). El AMPc (nM) estuvo significativamente aumentado con respecto al grupo no infectado y a otras fases de la enfermedad (1,99±0,09 nM, p<0,01). La respuesta a adrenalina estuvo disminuida (p<0,05), pero la contractilidad se mantuvo dentro de los valores del grupo no infectado. Los presentes resultados muestran que la transducción de señales del sistema beta adrenérgico cardíaco en la etapa indeterminada de la Enfermedad de Chagas está alterado en alguno de sus pasos lo que contribuiría a la instalación de la cardiopatía.

- 912. (7033) DIFUSION PASIVA COMO PRINCIPAL MECANISMO DE INGRESO DE ANTIHELMINTICOS A PARASITOS BLANCO.** MOTTIER, L.; ALVAREZ, L.; CEBALLOS, L.; LANUSSE, C.

Laboratorio de Farmacología, Fac.Cs.Vet., UNCPBA, Tandil. CONICET, ARGENTINA.

Las moléculas antihelmínticas deben alcanzar la biofase dentro del parásito blanco para ejercer su acción. Resultados obtenidos en nuestro Laboratorio indican que la penetración transtegumentaria/cuticular es la vía de entrada más importante de los fármacos benzimidazoles (BZD). Sin embargo, aún no se ha determinado si la naturaleza de dicha penetración responde a un fenómeno de difusión pasiva o a un proceso de transporte activo. El objetivo del presente trabajo experimental fue determinar el proceso implicado en el pasaje transtegumentario/cuticular de los fármacos BZD, fenbendazole (FBZ) y oxfendazole (OFZ) en nematodos y cestodes. Especímenes adultos de *Ascaris suum* (nematode) y *Moniezia benedeni* (cestode) fueron incubados durante 90 y 15 min, respectivamente, en buffer Krebs Ringer Tris (pH 7.4, 37°C) (1 g parásito/10 ml medio) en presencia de diferentes concentraciones FBZ y OFZ (1-30 nmol/ml, n=4). El análisis de FBZ/OFZ presente en el material parasitario fue realizado por HPLC. La concentración en *A. suum* y *M. benedeni* se incrementó en relación a la cantidad de droga presente en el medio. Se obtuvieron elevados coeficientes de correlación entre la concentración inicial de los fármacos bajo estudio en el medio de incubación y la concentración final alcanzada en el interior del nematode (r= 0.97) o cestode (r= 0.98). De los resultados obtenidos se concluye que el gradiente de concentración es un factor determinante en la cantidad de fármaco que alcanza el interior parasitario. El proceso de difusión pasiva es el mecanismo involucrado en el pasaje trans-tegumentario/cuticular de los antihelmínticos BZD al interior de cestodes y nematodos.

- 913. (7192) PRODUCCION DE OXIDO NITRICO Y RADICALES LIBRES EN HEPATOCITOS DE RATAS EXPUESTOS AL ANTIGENO DE SECRECION- EXCRECION DE TOXOCARA CANIS.** ECHENIQUE, CLAUDIA (1); OCHOA, J. ELENA (2); MAGARO, HORTENSIA (1)

Area Parasitología. Departamento Microbiología. Fac. de Cs. Bioq. y Farm. Unr; (2) IFISE - CONICET.

Toxocara canis (parásito nematode) causa larva migrans visceral y toxocariosis ocular. Las larvas infectivas producen el antígeno de secreción-excreción (TES) constituido por un set de glicoproteínas biológicamente activas in vivo e in vitro. En estudios in vivo, se observó que las larvas migran a hígado, pulmón, cerebelo, etc. Tanto el óxido nítrico (NO) como los radicales libres (ROS) han sido propuestos como efectores de la resistencia del huésped a patógenos, tales como larvas de helmintos. Objetivo: evaluar si TES induce la producción de NO y ROS en cultivos primarios de hepatocitos de rata. Metodología: TES se obtuvo según la técnica de Savigny y se confirmó por western blotting. Los hepatocitos se aislaron de ratas Wistar machos adultos (n=10) por la técnica de perfusión con colagenasa. Durante 24 hs, se cultivaron 2x10⁶ hepatocitos/placa con distintas concentraciones de TES (2 a 40 µg/ml, siendo TES1 la menor y TES2 la mayor de las concentraciones usadas). Además, se realizaron los correspondientes controles negativos (C). En un grupo de placas se agregó lipopolisacárido (LPS, 10 µg/ml) como control positivo. La formación de nitritos se evaluó en sobrenadantes de cultivos con el reactivo Griess (indicador de la producción de NO). La producción de ROS en hepatocitos se determinó por la fluorescencia generada con el método de Myhre. El contenido proteico se midió por el método de Lowry. Resultados: la producción de NO (media±DS, µM de nitrito/mg proteína, n=3) fue mayor (p<0.05) en los cultivos tratados con TES (TES1=26±1, TES2=76±3) con respecto a C=12±4 (control positivo LPS=85±6). TES aumentó (p<0.05, n=3) la producción de ROS (TES1=+37%, TES2=+74%, LPS=+75%) con respecto a C. TES induce la producción de NO y ROS en hepatocitos. En otras parasitosis, la inhibición de la producción de NO y ROS produjo mayor daño histológico en los órganos afectados. Los hallazgos aquí descritos podrían representar un mecanismo de defensa del huésped contra *T. canis*.

- 914. (7336) EVALUACION DE DIFERENTES REGIMENES DE DOSIFICACION DE ALBENDAZOLE PARA EL TRATAMIENTO DE LA HIDATIDOSIS EXPERIMENTAL.** 1CEBALLOS, L.; 1MORENO, L.; 1SANCHEZ BRUNI, S.; 1PECELIS, M.; 1ALVAREZ, L.; 2ELISSONDO, C.; 2DOPCHITZ, M.; 2DENEGRI, G.; 1LANUSSE, C.

1Lab.Farmacología, FCV, UNCPBA, Tandil; 2Lab. Zoonosis Parasitarias, FCEyN, UNMDP, Mar del Plata.

Albendazole (ABZ) es un fármaco aprobado para el tratamiento de la hidatidosis humana. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia clínica de dos regímenes terapéuticos de ABZ, utilizando como modelo experimental el desarrollo de quistes hidatídicos en ratones. El estudio fue dividido en dos fases experimentales. Fase I: Ratones BalbC (n= 20) fueron infectados por vía intraperitoneal con protoescolices de *Echinococcus granulosus* (1500 protoescolices/ratón). Ocho meses post-infección los animales fueron divididos en dos grupos: Grupo 1: tratados con ABZ (solución acuosa, 50 µg/ml) a la dosis de 0.5 mg/kg durante 15 días (cada 12 h); Grupo 2 (control) tratados con el vehículo como placebo siguiendo el mismo esquema terapéutico del Grupo 1. Fase II: dos meses después de finalizada la Fase I, ratones de similares características a los descriptos fueron divididos en dos grupos: Grupo 3: tratados con la misma formulación/dosis de ABZ que el Grupo 1, durante 30 días (cada 48 h); y Grupo 4: (control) tratados con el vehículo como placebo. Finalizado el tratamiento los animales fueron sacrificados, registrándose el peso de los quistes hidatídicos de cada animal. En forma complementaria y con el fin de facilitar la interpretación de los resultados obtenidos tras los diferentes regímenes tera-

péuticos, se realizó la valoración de las concentraciones plasmáticas de ABZ-sulfóxido (ABZSO, metabolito activo de ABZ). Mientras que no hubo diferencias en los pesos de los quistes recuperados de los Grupos 3 y 4, se observó menor peso ($P < 0.05$) en los quistes recuperados del Grupo 1 comparado con su control. ABZSO se detectó en la circulación sistémica durante 6 h post-tratamiento. En conclusión, los mejores resultados terapéuticos observados cuando el intervalo entre dosis fue menor (12 h), se relacionaron con la presencia de concentraciones sostenidas de ABZ/ABZSO.

915. (7357) EFECTO DE LA HEMINA SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE DE TRYPANOSOMA CRUZI. CICCARELLI, ALEJANDRA; ARAUJO, LIDIA; LOMBARDO, ELISA; BATLLE, ALCIRA

Centro de Investigación sobre Porfirinas y Porfirias, CONICET-UBA

Trypanosoma cruzi requiere el agregado de compuestos hémicos para su crecimiento in vitro. Al establecer la concentración óptima de hemina para utilizar durante el cultivo del parásito, observamos que niveles mayores de 15 mg/l producían una marcada disminución del crecimiento con cambios morfológicos característicos del pasaje de epimastigote a amastigote. Dado que la hemina es capaz de inducir stress oxidativo en sistemas biológicos, correlacionamos el estado del sistema de defensa antioxidante de T. cruzi con los niveles de hemina (0-30 mg/l). Considerando la falta de actividad de catalasa y peroxidasa evaluamos actividades de superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APx) y tripanotona reductasa (TryR), junto con el contenido de grupos tioles y proteínas totales. Las tres enzimas muestran un valor máximo de actividad (SOD $4,50 \pm 0,05$ UE/mg, APx $9,50 \pm 0,04$ UE/mg y TryR $3,72 \pm 0,08$ UE/mg) a la concentración de hemina óptima para el cultivo (5 mg/l). Entre 5-30 mg/l de hemina las actividades de Try R y SOD decaen un 30-35 % mientras que la APx lo hace un 20%. El contenido de grupos tioles se mantiene constante ($15,53 \pm 0,89$ nmoles/mg prot) entre 0-10 mg/l de hemina para luego decaer hasta $9,54 \pm 0,46$ nmoles /mg prot para hemina 30 mg/l. La cantidad de proteínas totales se evaluó para hemina 0, 10 y 30 mg/l variando los días de crecimiento entre 3 y 7. Sin el agregado de hemina las proteínas aumentan progresivamente desde $6,41 \pm 0,18$ a $8,73 \pm 0,25$ ug/10(6)cél., mientras que para hemina 10 mg/l los valores son un 10- 15% más altos y el aumento se observa entre los días 3 y 5, manteniéndose luego constante. Un comportamiento diferente se obtuvo para hemina 30 mg/l, las proteínas aumentan entre los días 3 y 5 (desde $9,26 \pm 0,10$ a $10,12 \pm 0,08$ ug/10(6)cél), para luego disminuir progresivamente hasta $7,24 \pm 0,25$ ug/10(6)cél. Estos resultados avalarían que altos niveles de hemina inducen un daño oxidativo y deterioro del sistema de defensa antioxidante de T. cruzi.

916. (7459) HORMONA DE CRECIMIENTO RECOMBINANTE HUMANA EN LA MODULACION DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCION CON T. CRUZI. SARRIÓ, LEANDRO (1); DAVILA, HECTOR (2); FELDMAN, SARA (1)

(1) *Cat. Química Biológ.*, (2) *Inst. Inmunología, Fac Cs Médicas, UNR*

En la enfermedad de Chagas la activación de macrófagos estaría implicada en mecanismos inmunoregulatorios de defensa del huésped. Se han brindado evidencias de que la hormona de crecimiento activaría la capacidad fagocítica de macrófagos. Resultados preliminares nuestros mostraron un descenso de la parasitemia de ratas infectadas frente al tratamiento con HCrh: se decidió estudiar si los efectos estaban relacionados a incrementos en la producción de metabolitos reactivos del oxígeno. Ratas machos de la línea «I» se dividieron en dos grupos, T (infectadas con 1×10^6 de parásitos Tc, cepa tulahuén) y C (ratas sin infectar). Cada grupo se subdividió en dos subgrupos: H (recibieron 15 días HCrh BIOSIDUS 100 mui/día/rata) y p (recibieron dosis placebo). A partir del suero obtenido por punción car-

díaca de los animales se realizaron estudios de los niveles de los niveles de parasitemia y de óxido nítrico, NO(método colorimétrico de Griess , post tratamiento con bacterias Pseudomonas oleovorans (cepa ATCC 8062), para reducir todo el NO a nitrito). Se realizaron ensayos de estallido respiratorio a partir de macrófagos peritoneales, ajustando las células a 1000000 /m, utilizando luminol como revelador. Los valores de parasitemia mostraron diferencias significativas, mediana Tp>TH, $p < 0.001$ (t Student). Los niveles de NO mostraron diferencias significativas entre grupos (ANOVA), siendo los valores para TH>Tp, ($p < 0.01$), Tp>Cp ($p < 0.01$), Tp>CH ($p < 0.01$), Cp vs CH no dif. significativas (test de DUNCAN). Hubo diferencias significativas entre grupos para ensayos de estallido respiratorio (ANOVA), TH>Tp, ($p < 0.01$), Tp>Cp ($p < 0.01$), Tp>CH ($p < 0.01$), (test de DUNCAN). Estos resultados proveen evidencias de que la hormona de crecimiento participaría en efectos capaces de modular el curso de la respuesta inmune, potenciando la producción de metabolitos reactivos del oxígeno, con resultados inhibitorios en lo que respecta al crecimiento de T. cruzi.

917. (7479) CHAGAS CONGÉNITO: DISTINTAS CEPAS DE TRYPANOSOMA CRUZI EN RELACIÓN A INFECCIÓN PLACENTARIA Y ÓXIDO NÍTRICO (NO). TRIQUELL, FERNANDA; DIAZ LUJÁN, CINTIA; FREILIJ, HÉCTOR (1); FERNÁNDEZ, RUTH A (2); FRETES, RICARDO E.

Ila. Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología, Fac. Cs. Médicas, UNC (1) Lab. de Parasitología y Chagas Hospital «R. Gutiérrez»; (2) Cátedra de Física Biomedica, FCM, UNC

El Chagas congénito es causado por T.cruzi al atravesar la placenta e infectar al feto. Su baja incidencia, podría deberse a la competencia inmunológica de la placenta, citoquinas y el NO. Las diferentes cepas pueden tener diferentes efectos sobre NO placentario, afectando la infección productiva. Objetivos: a) Determinar si la infección productiva en placentas in vitro es distinta con las diferentes cepas de T.cruzi. b) Determinar el efecto de diferentes cepas en la producción de NO placentario. c) Relacionar nitritos, con la infección placentaria y viabilidad parasitaria. Materiales y Métodos: Co-cultivos de 30 mg de explantos de placentas humanas normales con $1 \times 10(6)$ T.cruzi cepas (Tulahuén) y aislada de caso congénito (Lucky) por 24 hs. Medición de infección por: recuento de T. cruzi en medios sobrenadantes de co-cultivos y de amastigotes por nido mediante H/E y morfometría. En los sobrenadantes de los cultivos se midió NO con técnica de Griess. Controles: co-cultivos de células VERO con T.cruzi y placentas sin T.cruzi. Resultados: Concentración de nitritos ($\mu\text{mol/g}$ placenta), 0,448 placenta control; 0,725 Lucky; 0,915 Tul y en VERO 0,0059 μmol nitritos/10(6) cel. El porcentaje de infección en los explantos placentarios de los diferentes co cultivos fueron 0,336% Lucky, 0,235% Tul y en co-cultivo de VERO fue de 2,796% y la cantidad de amastigotes por nido fue de $3,72 \pm 2,14$ Lucky, $4,14 \pm 2,18$ Tul; $22,46 \pm 7,04$ VERO. El porcentaje de parásitos vivos en el sobrenadante de co-cultivo fue 11% Lucky, 0,54% Tul, 22,25% VERO. La cepa aislada de caso congénito tiene mayor viabilidad parasitaria, similar reproducción, induciendo menor producción de nitritos y produciendo un mayor porcentaje de infección, con respecto a cepa Tul. El Chagas congénito podría producirse por diferencias en la inducción de NO placentario y a una susceptibilidad diferenciada entre las cepas de T.cruzi a los agentes deletéreos y no a la capacidad de reproducción en la placenta.

918. (7708) EFECTO IN VITRO DEL FLUBENDAZOLE SOBRE PROTOESCÓLICES DE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS. ELISSONDO, MARÍA CELINA (1); DOPCHIZ, MARCELA CECILIA (1); DENEGRI, GUILLERMO (1); CEVALLOS, LAURA (2); ALVAREZ, LUIS (2); SERGIO, SANCHEZ BRUNI (2); LANUSSE, CARLOS (2)

(1) *Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, FCEyN, UNMdP, Mar del Plata;* (2) *Laboratorio de Farmacología, FCV, UNCPBA, Tandil*

Los antihelmínticos benzimidazoles utilizados para el tratamiento de la hidatidosis humana son: mebendazole y albendazole. Flubendazole (FLBZ) no ha sido considerada como una droga adecuada debido a que en humanos demostró baja eficacia. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto protoescolicida de FLBZ sobre protoescolícos de *Echinococcus granulosus* bajo condiciones in vitro. Protoescolícos obtenidos de quistes hidatídicos de hígados y pulmones bovinos fueron incubados en tubos Leighton (1500 protoescolícos/tubo) en presencia de FLBZ (disuelto en DMSO) a las concentraciones finales de 10, 5 y 1 µg/ml. No se realizaron cambios de medio. Protoescolícos suspendidos en medio de incubación y suplementados con DMSO se utilizaron como controles. Los tubos se observaron diariamente al microscopio invertido registrando las alteraciones morfológicas. Test de exclusión con azul de metileno para determinación de vitalidad se realizó cada 6 días con toma de muestras para microscopía electrónica de transmisión y barrido. El período del ensayo se extendió por 46 días. Durante el experimento FLBZ en concentraciones de 10, 5 y 1 µg/ml produjo un efecto protoescolicida reduciendo la vitalidad de los protoescolícos a 35.6 ± 0.7% luego de 18 días. La máxima acción protoescolicida se observó al día 25 donde el número de protoescolícos vitales fue de 13.9 ± 5.9%. Al día 30 no se encontraron protoescolícos vivos a 10 y 1 µg/ml y a 5 µg/ml solo se observó un 0.7 ± 0.7% de protoescolícos vivos. Los resultados de las pruebas de vitalidad coinciden con lo observado en la microscopía electrónica de transmisión y barrido donde se evidenciaron alteraciones en el tegumento de los protoescolícos (día 6), desorganización rostellar (día 12) y gran cantidad de protoescolícos con pérdida completa de la estructura (día 25). El marcado efecto protoescolicida observado in vitro, será corroborado con estudios in vivo en ratones.

919. (7839) INFLUENCIA DE LA TESTOSTERONA SOBRE LA INFECCIÓN AGUDA EXPERIMENTAL CON TRYPANOSOMA CRUZI (TC) EN RATAS «L» DE DIFERENTES EDADES. PASCUTTI, MARÍA FERNANDA; MARTIN, ANA PAULA; BERRA, HÉCTOR; FONTANELLA, GERMÁN; PEZZOTTO, STELLA; BOTTASSO, OSCAR; ROMANO, MARTA (1); REVELLI, SILVIA

Instituto de Inmunología, Fac. Cs. Médicas, UNR; Dpto. de Fisiología, Biofísica y NC. CINVESTAV, México DF, México.

En trabajos anteriores se demostró que el desafío con Tc en ratas macho de línea «l» al destete (21-28 días, 10(6) tripomastigotes, cepa Tulahuén, vía sc; modelo D) provoca una enfermedad aguda bien evidente, con parasitemias (P) elevadas, autorresolutiva dentro de los 30 días post-infección (pi). En los animales adultos (70-120 días, 7. 10(6) tripomastigotes; modelo A), la infección aguda es de menor jerarquía, con escasas parasitemias. Dado el rol de los esteroides sexuales en la respuesta a infecciones, se determinó si la presencia de testosterona tenía relación con las diferencias en la resolución de la enfermedad aguda en ambos modelos. Para ello, animales de 12-14 días de vida fueron castrados (G1) o sometidos a una operación simulada (G2). Los animales de G1, G2 y G3 (control intacto) se infectaron según el modelo A, evaluándose las P durante el primer mes pi, el peso corporal (PC) hasta el día 106 de vida, y el peso del timo (PT) en esta última fecha. Las P de G1 y G2 no difirieron con respecto a G3, es decir, fueron negativas para los 3 grupos; mientras que, en G1, el PC se redujo y el PT, tanto absoluto como relativo, aumentó (p<0.05). En paralelo, a un grupo de animales se le inyectó 1mg/kg de propionato de testosterona (T), día por medio, vía sc, de los 15 a los 21 días de vida, momento de la infección según el modelo D. Luego, al 50% de los animales se le continuó administrando T por 3 semanas (G4) y al resto se le interrumpió el tratamiento (G5). Los controles respecto de G4 y G5 recibieron sólo vehículo (G6 y G7). La P (parásitos/100 campos; mediana-rango) en G4: 6 (2-36) y G5: 10 (2-18), día 14 pi, fue más alta que en G6: 2 (0-12) y G7:

0 (0-15), p<0.05. La castración no modificó la parasitemia aunque se evidenció un aumento del peso del timo. Por otra parte, la administración de testosterona previa al destete disminuyó la respuesta anti-Tc de las ratas prepúberes.

920. (7971) INFECCIÓN MURINA EXPERIMENTAL POR TRYPANOSOMA CRUZI: RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS T TCR Vβ9+ DE GANGLIOS LINFÁTICOS E INFILTRADOS MUSCULARES. MIRKIN, GERARDO; VOGT, JAVIER; MINCZ, MARIANA

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina. U.B.A.

En estudios previos demostramos la existencia de linfocitos T (LT) autorreactivos (Mirkin y col., 1997) y comunicamos que LT que expresan el receptor Vβ9 (TCRVβ9), predominan en lesiones musculares con respecto a los ganglios periféricos de ratones C3H/HeN crónicamente infectados con *Trypanosoma cruzi* (Tc) (Mincz y col.; SAI, 2003). El objetivo del presente trabajo fue analizar si dichos linfocitos reconocen antígenos (Ag) parasitarios o autoAg (músculos esquelético y cardíaco). Se estudiaron ratones C3H/HeN machos crónicamente infectados (>5 meses pi) con las poblaciones K98 ó RA de Tc; la primera de ellas altamente miotrópica. Purificamos LT TCRVβ9+ de ganglios linfáticos e infiltrados de músculo esquelético por selección inmunomagnética y realizamos ensayos de proliferación mediante incorporación de ³H-timidina en presencia o ausencia de Ag parasitarios, AutoAg y concanavalina A (ConA). Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Bonferroni por lotes.

K98	P	RA	P	K98 vs RA	P
Mus K98 + CPA + ConA > Mus K98 + CPA + AgTc	p<0,001	Mus RA + CPA + ConA < Mus RA + CPA + AgTc	p<0,001	Mus K98 + CPA + Con A > Mus RA + CPA + ConA	p<0,001
Mus K98 + CPA + AgTc > Gx K98 + CPA + AgTc	p<0,01	Mus RA + CPA + AgTc > Gx RA + CPA + AgTc	p<0,001	Mus K98 + CPA + AgTc > Mus RA + CPA + AgTc	p<0,01
CPA + AgTc		CPA + AgTc		CPA + AgTc	
Mus K98 + CPA + Con A < Gx K98 + CPA + ConA	ns	Mus RA + CPA + Con A < Gx RA + CPA + ConA	p<0,001	Gx K98 + CPA + Con A > Gx RA + CPA + ConA	p<0,001
Gx K98 + CPA + ConA > Gx K98 + CPA + AgTc	ns	Gx RA + CPA + ConA > Gx RA + CPA + AgTc	p<0,001	Gx K98 + CPA + AgTc > Gx RA + CPA + AgTc	p<0,001

Los resultados obtenidos sugieren que la frecuencia de LT TCRVβ9+ que reconocen Ag de Tc es mayor en músculo esquelético que en ganglios de ratones infectados. Además, la frecuencia de estos LT es mayor en los ratones infectados con K98 que con RA, independientemente del compartimento (linfoide o extralinfoide) analizado. Los LT TCRVβ9+ no reconocen autoAg (datos no mostrados), lo que sugiere que esta familia de LT se expande preferencialmente en respuesta a Ag parasitarios.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS 3: VIROLOGÍA

921. (6826) INFECCIONES EXPERIMENTALES POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (HCV). MODULACIÓN DE RECEPTORES ASOCIADOS A PERFL TH1 Y TH2. PARODI, CECILIA; MASSUD, IVANA; BARÉ, PATRICIA; BELMONTE, LILIANA; FELIPPO, MARTA; E DE BRACCO, M MARTA; RUIBAL-ARES, BEATRIZ

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina

La característica principal de la infección por HCV es su persistencia en más del 85% de los casos. Para lograr el clearance es necesaria una respuesta celular T (RT) CD8 eficaz acompañada de una fuerte RT CD4 de tipo Th1. Existe dificultad para estudiar al HCV por la ausencia de modelos de cultivo in vitro. Nuestro objetivo fue lograr infecciones experimentales y mostrar su impacto sobre el perfil asociado a la respuesta Th1 y Th2. Desarrollamos un sistema de cultivo prolongado, que permitió ensayos de infección sobre células mononucleares periféricas

(CMP) de dadores normales (n=5) con distinta dosis infectante (530-14000 UI/ml) proveniente de sobrenadantes (SN) de líneas celulares linfoblastoideas B (LCL-B) productoras de HCV. Se comprobó el éxito de las infecciones detectando el genoma de HCV (RT-PCR) en CMP y/o SN de cultivo. Las CMP infectadas (CMP-I), a lo largo del cultivo (14-27 días), mostraron un descenso significativo de los LT CD4 (52.16 ± 5.02) respecto a las CMP control (CMP-C) (60.87 ± 4.79) ($p < 0.05$). El nivel de activación T CD4 (CD69+), aumentó levemente en ambos casos. La expresión inicial de CXCR3 (46.04 ± 3.81), receptor de quimioquinas asociado a perfil Th1, disminuyó hasta el día 15 en las CMP-C (18.00 ± 4.76); descenso que fue significativamente mayor en las CMP-I (7.98 ± 2.75) ($p < 0.05$). El receptor CCR4, asociado a perfil Th2 (41.85 ± 1.67) descendió en las CMP-C (5.84 ± 3.21), teniendo un comportamiento variable en las CMP-I. El HCV obtenido de LCL-B productoras, utilizado en ensayos de infección, permitió demostrar la capacidad del virus de infectar y replicar in vitro. Algunas proteínas virales pueden unirse a receptores celulares inhibiendo parcialmente la producción de IFN, alterando la RT Th1 y favoreciendo la RT Th2. La disminución de CXCR3 encontrada, podría asociarse al ambiente de citoquinas presentes, a la unión con su ligando (quimioquina), o a la acción del virus y/o sus proteínas sobre las CMP-I.

922. (7080) GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (HCV) EN LÍNEAS CELULARES B LINFOBLASTOIDEAS (LCL-B) DERIVADAS DE CULTIVOS DE PACIENTES CO-INFECTADOS HCV-HIV. COMPARACIÓN CON GENOTIPOS EN PLASMA. BARÉ, PATRICIA; MASSUD, IVANA; BELMONTE, LILIANA; PARODI, CECILIA; CORTI, MARCELO; DE TEZANOS PINTO, MIGUEL; PÉREZ BIANCO, RAÚL; ELIZALDE DE BRACCO, MMARTA; RUIBAL, BEATRIZ

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. Fundación de la Hemofilia

La presencia concomitante de más de un genotipo de HCV puede resultar en la dominancia de uno de ellos y la exclusión o supresión de otros. Algunos métodos de genotipificación carecen de la capacidad para distinguir la totalidad de genotipos co-existentes; más aún, en el caso de provenir de sitios extrahepáticos. Para la comparación de genotipos de HCV en plasma y células mononucleares periféricas (CMP), realizamos el cultivo sin estímulo de CMP de 4 pacientes hemofílicos co-infectados HCV-HIV que generaron LCL-B productoras de HCV. Tipificamos el genoma de HCV en plasma, sobrenadantes en los días de cultivo y luego de la obtención de las líneas. Nos basamos en la técnica de genotipificación comercial INNOLIPA y en técnicas con cortes con enzimas de restricción (RFLP). En 3 de 4 pacientes, los genotipos resultantes en cultivo concordaron con los evidenciados en los plasmas (1b). En uno de los pacientes que fue cultivado en 2 fechas distintas, se hallaron discordancias. A pesar de que en plasma se encontró el genotipo 2a en ambas fechas, una de las líneas resultó ser 1b y la otra 2a. La posibilidad de persistir en células mononucleares periféricas parece no ser privativa de un sólo genotipo de HCV. La falta de detección en plasma del genotipo 1b, en el caso discordante, podría deberse a la exclusión del mismo de células hepáticas y a su reclusión en CMP o a la imposibilidad de detección conjunta de ambos genotipos, debido a limitaciones de las técnicas de genotipificación. El resurgimiento de otros genotipos a partir de distintos sitios o reservorios del virus debería ser tomado en cuenta en el momento de tratar a los pacientes infectados y probablemente, el monitoreo de los mismos podría constituir un estudio útil que aportara datos importantes sobre la falta de respuesta o respuesta viral no sostenida.

923. (7107) INFECCIÓN DE MUSCULOS ESTRIADOS DURANTE LA ESTOMATITIS EXPERIMENTAL PRODUCIDA POR EL VIRUS HERPES SIMPLEX-1. GONZALEZ, MARIA INES; ROSA, ALCIRA (1); SANJUAN, NORBERTO (2)

*Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología, UBA (2)
Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA*

La progresión de la primoinfección bucal por virus Herpes simplex-1 (HSV-1) dista de ser conocida. El objetivo de este trabajo fue estudiar el avance del virus por los distintos tejidos mediante el desarrollo de un modelo de primoinfección en ratones neonatos. Se inocularon 24 ratones Balb/c de 48 hs de vida con 5×10^5 ufp de HSV-1 (cepa ATCC McIntyre) por vía intradérmica en el labio superior y otros 12 fueron empleados como controles inoculados con medio de cultivo celular, sin virus. Entre 24 y 72 hs post-infección (pi), los animales inoculados con HSV-1 murieron o fueron sacrificados, y sus tejidos fueron fijados e incluidos en parafina. Se detectaron antígenos de HSV-1 en cortes histológicos seriados empleando el método de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) contrastado con hematoxilina. Se observó que, aparte de la replicación del virus en el epitelio, su avance por los nervios y el compromiso de ganglios simpáticos y del encéfalo, se detectaban antígenos de HSV-1 invariablemente en músculos del piso de la boca, la lengua y el resto de la musculatura facial. Las áreas con inmunomarcación positiva también evidenciaban lesiones compatibles con efecto citopático de Herpes. Para confirmar este hallazgo, se realizaron cultivos organotípicos de tejido muscular de la lengua sobre Spongostan, en la interfase líquido/gaseosa conformada por el medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y una atmósfera de 5% de CO₂, que fueron infectados in vitro con HSV-1. Se observó que el virus infectó a estos cultivos en forma progresiva, empleando el método PAP, Western blot y aislamiento de virus en monocapas de células Vero a partir de homogenatos de los cultivos organotípicos y en distintos tiempos pi. Estas observaciones fueron complementadas con estudios de microscopía electrónica de transmisión. Se concluye que durante la primoinfección bucal experimental por HSV-1 el compromiso de la musculatura estriada facial es importante, y lleva a preguntar si algo similar ocurre en pacientes pediátricos.

924. (7132) REPLICACIÓN DEL HIV EN UNA LÍNEA LINFOBLASTOIDEA B, EBV+ (LCL-B) DE UN PACIENTE CON CARGA VIRAL PLASMÁTICA NO DETECTABLE. BELMONTE, LILIANA; PARODI, CECILIA; BARÉ, PATRICIA; DE CAMPOS NEBEL, MARCELO; SANJUAN, NORBERTO; BRACCO, MARIA M; RUIBAL-ARES, BEATRIZ

IIHema - Academia Nacional de Medicina; Cátedra de Microbiología - Facultad de Medicina - UBA

El 60% de los cultivos no estimulados de células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes HIV+, da origen a LCL-B. Uno de los factores determinantes de la generación de LCL-B, fue la elevada replicación del HIV en los cultivos (2654 ± 400 pg/ml). La probabilidad de detectar LCL-B productoras de HIV-1 (p24+) varió dependiendo del tiempo de tratamiento antiretroviral (ART) ininterrumpido: < 2 años, 6/9 (66%); entre 2 y 3 años, 5/23 (22%) y > de 3 años 1/16 (12.5%). En todos los casos la liberación máxima de p24 fue de 218 pg/ml (rango 10-218 pg/ml). En los pacientes con carga viral no detectable (CV ND) US, bajo ART prolongado, la replicación persistente del HIV puede ocurrir en células distintas de los linfocitos T y macrófagos, incluyendo linfocitos B, capaces de generar las LCL-B. En una de las LCL-B (CDK), obtenida de un paciente HIV+ con CV ND US por más de 4 años, no se observó replicación de HIV-1 en los cultivos durante los 50 días que precedieron a su aparición. Sin embargo, CDK liberó 18.200 pg/ml a los 10 días, partiendo de 25×10^4 cél/ml, con una producción similar por más de 12 meses. Por microscopía electrónica, se demostró la presencia del virus en las CDK. El 99.7% de las CDK fue CD20+, el 8% de ellas fue CXCR4+, con fenotipo y morfología similar a la de LCL-B clásicas. Se estudió la infectividad del sobrenadante de CDK utilizando distintas células blanco (CMP normales, LCL-B, línea T):

células blanco	CMP (linfocitos totales + macrófagos)	LCL-B (linfoblastos B)	Línea celular T HTLV+
máximo p24 (pg/ml)	657	11415	no infección

Los linfocitos B infectados pueden actuar como reservorio de HIV-1 persistente, pese a que la carga viral plasmática permanezca no detectable luego del ART. La dificultad para infectar las células CD4+, principales células blanco del virus, sugiere la presencia de un virus adaptado a replicar en linfocitos B.

925. (7311) REPLICACION DEL VIRUS POLIOMA MURINO EN UNA LINEA CELULAR DE MACROFAGOS. VILLAN OZUNA, PAOLA; SANJUAN, NORBERTO

Laboratorio de Patología Experimental. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina (UBA)

Los virus Polioma murinos pueden replicar en algunas cepas de ratones y luego inducir neoplasias en las mismas. Ya hemos reportado que tanto las cepas altamente oncogénicas del virus como las no oncogénicas se diseminan en ratones C3H BiDa desde el sitio de inoculación hacia diversos órganos por viremia. Esta es persistente en las cepas altamente oncogénicas y fugaz en las no oncogénicas. También hemos detectado antígenos estructurales de Polioma en macrófagos de la médula ósea y peritoneales. Nuestra hipótesis fue considerar a los macrófagos como potenciales blancos de replicación del virus durante su diseminación en el ratón. Para determinar inicialmente si los macrófagos pueden sustentar una infección lítica por Polioma se realizaron cultivos de células J-774, que son murinas y de estirpe macrofágica. Las células fueron cultivadas en placas de Petri plásticas que contenían cubreobjetos de vidrio, con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y en una atmósfera con 5% de CO₂. Los cultivos fueron infectados con una MOI de 1 ufp/célula de la cepa altamente oncogénica A2 o de la no oncogénica RA y otros fueron procesados como controles negativos. A las 0, 48 y 72 hs post-infección (pi) se fijaron los cubreobjetos en metanol y se realizó inmunofluorescencia indirecta (IFI) contra antígenos estructurales del virus. Las células restantes fueron lisadas, y con esos homogenatos se realizaron «western blots» y se re infectaron células NIH 3T3. También se estudió la progresión de la infección por microscopía electrónica (ME). A partir de las 48 hs pi se detectaron antígenos virales por IFI y «western blot», que fueron aumentando en intensidad y en número de células positivas hasta las 72 hs pi tanto en las células infectadas con la cepa altamente oncogénica como con la no oncogénica. Los resultados fueron confirmados por ME y por recuperación de virus infectivos. Se concluye que tanto la cepa altamente oncogénica como la no oncogénica de Polioma pueden replicar en macrófagos murinos, siendo este un mecanismo hipotético de diseminación en el ratón.

926. (7545) PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN LIQUIDOS ARTICULARES DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA. PEREZ, GERMAN R.(1); DI GENARO, SILVIA (2); TAMASHIRO, HECTOR (2); GARDIOL, DANIELA N.(1); GIRI, ADRIANA A.(1); TABORDA, MIGUEL A.(1)

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR; (1) Area Virología. FCBYF. UNR.; (2) Cátedra Inmunología. FCBYF. UNSL.

Desde hace 20 años, se sospecha del Virus de Epstein-Barr (VEB) como factor desencadenante de la artritis reumatoidea (AR) y de contribuir en su patogénesis. En trabajos previos, hemos demostrado que los títulos de anticuerpos (Acs) séricos contra el Antígeno de la Cápside Viral (VCA) del VEB pueden ser asociados al grado de actividad de la AR determinado por el índice DAS28-4. Objetivos: Relacionar los títulos de Acs anti-VCA en líquidos articulares con el grado de actividad de la AR. Determinar en esos líquidos la presencia de anticuerpos contra otros antígenos del VEB. Métodos: Se determinaron en líquidos articulares de 14 pacientes con AR y de 11 pacientes con artrosis, los títulos de Acs anti-VCA, la presencia de Acs contra antígenos nucleares del VEB (EBNA) y la presencia de Acs contra el Complejo de Antígenos Tempranos del VEB (EA/D y EA/R). El índice de actividad DAS28-4 se calculó solo en pacientes con AR. Re-

sultados: (mediana; IC95%) DAS28-4 [[controles]] 2,01 1,55-2,38; DAS28-4 [[AR]] 5,08 2,42-7,05 (p< 0,0000 vs controles). Acs anti-VCA [[controles]] 47 20-80; Acs anti-VCA [[AR]] 154 40-640 (p< 0,01 vs controles). Coeficiente de Spearman (CS) (r[[s]]) entre DAS28-4 [[AR]] vs Acs anti-VCA [[AR]]: 0,11 (p< 0,07 vs controles). Se observó positividad para Acs anti-EBNA y anti-EA en todas las muestras de pacientes con AR, mientras que los líquidos de pacientes con artrosis fueron negativos para esos marcadores virales. Si bien no se encontró relación entre el título de Acs anti-VCA y el índice DAS28-4 en pacientes con AR, si se observó presencia de Acs contra EBNA y el complejo EA a expensas del EA/D en los líquidos de estos pacientes. Estos datos obtendidos permitirían sugerir la contribución de la infección por VEB en los mecanismos autoinmunes asociados a AR.

927. (7612) EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN IN VIVO DEL ANTIVIRAL MELIACINA SOBRE EL CURSO DE LA INFECCIÓN HERPÉTICA GENITAL MURINA. PETRERA, ERINA; COTO, CELIA E.

Laboratorio de Virología, Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Meliacina (MAS), un antiherpético efectivo in vitro, fue evaluado in vivo utilizando un modelo murino de infección herpética genital. Ratones adultos BALB/c hembra fueron infectados i.vag. con HSV-2 cepa MS, separados en grupos de 10 y tratados en forma tópica con 5 dosis de MAS, Aciclovir (ACV) o vehículo (control) Se monitoreó diariamente la inflamación vaginal, enfermedad neurológica y muerte. Se colectaron fluidos vaginales y se midió la producción de virus (UFP), IFN-g y TNF-a y se determinó el título de virus en el cerebro de los animales muertos por encefalitis. La administración de MAS no protegió a los animales de la enfermedad ni se encontró un título menor de virus en los lavados en comparación con el control. Sin embargo, se observó un efecto terapéutico ya que en los controles se produjo la parálisis entre los días 6 y 7 p.i y la mediana del día de muerte fue 8 ± 0.89, mientras que en los tratados con MAS, la parálisis se produjo entre los días 7 a 15 p.i y la mediana fue 10.9 ± 1. El ACV protegió al 90% de los animales aunque mostraron lesiones y se aisló virus de los lavados en un log. menos que en los controles. Se encontró virus en el cerebro de todos los animales muertos por enfermedad y si bien hubo variaciones en los títulos, ya que los controles mostraron títulos mayores que los tratados con MAS se pudo concluir que hay un umbral por debajo del cual no se produce muerte, ya que animales tratados con ACV, sacrificados, mostraron títulos cercanos a 1 log. Para corroborar la hipótesis de que MAS actuara favoreciendo la respuesta innata se midió la producción de TNF-a siendo de 12 ± 0.67 pg/ml para MAS y de 7 ± 0.66 pg/ml para el control. En relación al IFN-g no se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratado con MAS. Estos resultados sugieren que MAS afectaría la respuesta inmune ya que se observó un menor grado de severidad en las lesiones, mayor tiempo de sobrevivencia de los animales y menor título de virus en el cerebro. El aumento de TNF-a parecería avalar esta hipótesis.

928. (7928) PREVALENCIA DE VHC, VHB Y VIH EN PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS. REMESAR, MC; GAMBA, C; KUPERMAN, S; MARCOS, MA; MIGUEZ, G; GUASP, G; CALDAROLA, S; PEREZ BIANCO, R; MANTEROLA, A; DEL POZO, A

Hospital Nacional de Pediatría Prof Dr JP Garrahan; Hospital Nacional Prof Dr A Posadas - Academia Nacional de Medicina.

El riesgo de transmisión de infecciones por transfusión es un tema de continua investigación. En nuestro país el conocimiento acerca de infecciones post-transfusionales (IPT) es escaso y generalmente fortuito. La OPS recientemente coordinó una investigación sobre VHC y otros marcadores de infección en pacientes politransfundidos (PP) en Latinoamérica (EpiSangre VHC América). Diseño: estudio transversal multicéntrico. En nuestro

país se incluyeron 504 PP (que recibieron como mínimo 10 estímulos transfusionales alogeneicos en al menos dos ocasiones diferentes). Se realizó un cuestionario estandarizado, se obtuvieron datos de la historia clínica y muestras de plasma y suero de cada paciente. Los marcadores estudiados fueron: anticuerpos a-VHC, a-VIH, a-HBcore y AgHBs. Las prevalencias se presentan con su IC95% (* indica que incluye al cero). Resultados: Se incluyeron 182 mujeres (36,1%) y 322 varones (63,9 %); mediana de edad 12 años (intervalo 0,1-89,2 años). Causas por las cuales recibieron transfusiones: desórdenes onco-hematológicos (61,3%), hemofilia y otros trastornos de la coagulación (Grupo H, 19%), pérdida sanguínea aguda (10,7%), hemoglobinopatías (6,9%), hemodilisis (1%), más de una de las precedentes (1%). Prevalencias: Grupo H (n=96): VHC=42,7 (32,2-53,1)%, a-HBcore=19,8 (11,3-28,3)%, VIH=3,1%*. Grupo No-H (n=408): VHC=1,5 (0,3-2,6)%, a-HBcore=1,2 (0,1-2,3)%, VIH=0,5%*. Se encontró un sólo paciente reactivo para AgHBs (dentro del Grupo H). Existe asociación entre haber recibido transfusiones antes de la implementación del tamizaje obligatorio para a-HCV en donantes de sangre y esta infección en PP (X², p<10<3). Estos resultados constituyen una investigación actualizada sobre IPT en PP en nuestro país (si bien podría no ser representativa de la población nacional de PP). La principal prevalencia encontrada fue VHC, siendo su estudio en donantes de sangre el de más recientes introducción. Los pacientes con hemofilia son el grupo diagnóstico de PP principalmente afectado.

929. (8064) INFECCIÓN DUAL CON EL SUBTIPO B Y LA FORMA RECOMBINANTE B/F DE HIV-1 EN ARGENTINA. CEBALLOS, ANA (1); ANDREANI, GUADALUPE (1); RABINOVICH, ROBERTO D (1); LOSSO, MARCELO (2); CARR, JEAN (3); WEISSENBACHER, MERCEDES (1); MARTINEZ PERALTA, LILIANA (1)

(1) Depto de Microbiología, Fac. Medicina, UBA.; (2) Htal Ramos Mejía, BS As.; (3) Jackson Foundation, EEUU.

Antecedentes: en la Argentina la forma recombinante B/F es prevalente en heterosexuales y en usuarios de drogas inyectables, mientras que en hombres homosexuales es más frecuente el subtipo B. Sin embargo, una búsqueda sistemática de infecciones duales con ambos subtipos no ha sido realizada. Objetivo: identificación de infecciones duales en personas infectadas con HIV-1 con doble riesgo de transmisión: heterosexual y homosexual. Métodos: se analizaron muestras de plasma de 15 individuos con doble riesgo de contagio para HIV de Buenos Aires. Todos ellos firmaron el consentimiento informado, completaron un cuestionario sobre aspectos sociodemográficos y comportamientos de riesgo. Se amplificó por RT-PCR el gen pol del HIV-1 y se obtuvieron entre 12 y 21 clones por muestra que fueron secuenciados. Los árboles filogenéticos y los análisis de bootscanning se realizaron para evidenciar la presencia de recombinantes. Resultados: 8 individuos presentaban virus del subtipo B y los 7 restantes formas recombinantes B/F de HIV-1. El análisis de los clones reveló la presencia de una infección dual en un individuo: subtipo B (19/20 clones) y recombinante B/F (1/20 clones). Este individuo fue diagnosticado como HIV + hace 14 años y es asintomático. Declaró contactos anteriores heterosexuales pero únicamente homosexuales en los últimos 10 años. No es usuario de drogas intravenosas. Está bajo tratamiento antirretroviral desde agosto del '95, actualmente tiene un carga viral de 2.46 log y 582 CD4/mm³. Conclusión: el análisis de las infecciones duales es importante para estudiar el origen y la evolución de las nuevas formas recombinantes de HIV-1. Dada la distribución diferencial del subtipo B y la forma recombinante B/F en nuestro país, el comportamiento de doble riesgo (hetero y homosexual) aumenta la posibilidad de encontrar una infección dual, lo cual debería ser considerado en estudios epidemiológicos y relacionados con vacunas.

930. (8078) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES CELULARES LUEGO DE LA INFECCIÓN POR ADENOVIRUS 7H

POR TÉCNICAS DE BIOARRAYS. BARRERO, PAOLA; MISTCHENKO, ALICIA SUSANA

Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez

Antecedentes: Entre los agentes causantes de infección respiratoria aguda en niños, los Adenovirus 7h (Av7h) se asocian frecuentemente a casos fatales de enfermedad respiratoria aguda. Los experimentos de bioarrays combinan las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y la detección por fluorescencia. De esta manera el nivel de expresión de cada gen se reporta de acuerdo al número de copias de RNA mensajero (mRNA) presentes en los oligonucleótidos inmovilizados en el array y es proporcional a la intensidad de los cDNA detectados por hibridación. Objetivo: Detectar mediante técnicas de bioarrays alteraciones de los niveles de mRNA celular luego de la infección por Av7h. Materiales y métodos: Se infectaron células Hep-2 con la cepa patrón de Av7h y junto con su control sin infectar se recolectaron a las 24 horas post-infección para extracción de RNA total. Se generó cDNA doble cadena a partir de 2 µg de RNA. La transcripción in vitro se realizó en presencia de biotina y 5, 10 y 20 µg del cRNA obtenido fue fragmentado y depositado en cada bioarray conteniendo 20.000 genes. Luego de la hibridación y lavado se realizó la detección con estreptavidina conjugada con fluoróforo (Cy5). Los portaobjetos fueron explorados a 635 nm. Se determinó que 20 µg cRNA/ bioarray era la cantidad óptima para la detección de fluorescencia. De los 20.000 genes testeados, 421 mostraron una diferencia mayor de 2 veces en su expresión cuando se compararon los bioarrays provenientes de células infectadas versus los controles sin infectar. Los genes celulares afectados se identificaron por homología con genes depositados en bases de datos públicas. El 50% de ellos está relacionado con la entrada de la célula en fase S del ciclo celular, dando así un entorno ideal para la replicación viral. En menor medida se detectaron genes relacionados con mecanismos de escape que protegen la célula infectada de la defensa antiviral del organismo. Este trabajo contribuye con la exploración de los mecanismos implicados en la infección celular por Av7h.

FARMACOLOGÍA 7: FARMACOLOGÍA VETERINARIA

931. (6838) SULFOXIDACIÓN DE TRICLABENDAZOLE EN FASCIOLA HEPÁTICA. IDENTIFICACIÓN DE LAS VÍAS METABÓLICAS INVOLUCRADAS Y SU POSIBLE RELACIÓN CON EL MECANISMO DE RESISTENCIA. SOLANA, HUGO DANIEL; RODRÍGUEZ, J.A.; ²FAIRWEATHER, I.; ¹LANUSSE, C.E.

Lab. Biol. Cel. y Mol.- Dpto. Cs. Biológicas - FCV - UNCPBA; ¹Lab. Farmacol., FCV-UNCPBA, Argentina; ²Sch. Biol. & Biochem. Queen's Univ. Belfast, UK

Triclabendazole (TCBZ) es un antihelmíntico benzimidazole (BZD) halogenado utilizado para el control de Fasciola hepática por poseer mayor actividad fasciolicida que los demás BZDs. La aparición de cepas resistentes a TCBZ ya ha sido documentada, teniendo una enorme significancia económica en producción animal. Esta droga es metabolizada a TCBZ sulfóxido (TCBZSO) a través de mecanismos de detoxificación propios del trematode. Nuestro trabajo previo ha demostrado que una cepa de F. hepática resistente a TCBZ (R) posee más capacidad metabólica que una susceptible (S), lo cual podría contribuir al desarrollo de resistencia al fármaco. Las vías metabólicas involucradas en este proceso requieren ser identificadas. En el presente trabajo se evaluó el grado de participación de los sistemas enzimáticos oxidativos Flavin Monooxigenasa (FMO) y Citocromo P450 en la generación del metabolito TCBZSO en microsomas (MS) de F. hepática S y R. Los MS fueron incubados con 40 µM de TCBZ en presencia/ausencia de metimazole (MTZ), sustrato del sistema FMO; o butóxido de piperonilo (BP), inhibidor de Cit. P450. Las muestras incubadas fueron analizadas por HPLC. TCBZ fue

oxidado a TCBZSO por ambas fracciones microsomales (F. hepática S y R) y ambas vías metabólicas (P450 y FMO) están involucradas en dicha sulfoxidación. La oxidación disminuyó un 12 % (en ambas cepas) en presencia del inhibidor BP. Sin embargo, en presencia de MTZ la formación del metabolito sulfóxido decreció en un 44% en la cepa R, siendo mayor que la disminución observada en la cepa S del parásito (34%) ($P > 0.001$). Estos resultados demuestran la mayor participación del sistema FMO en la oxidación de TCBZ por F. hepática y aportan evidencias de que esta vía metabólica podría estar sobreexpresada en el trematode resistente a TCBZ. La implicancia de estos cambios metabólicos en el mecanismo de resistencia de TCBZ en F. hepática están bajo consideración en nuestros laboratorios.

932. (6995) FARMACOCINÉTICA DE DOS PREPARADOS COMERCIALES DE CEFALEXINA ADMINISTRADOS A CANINOS ADULTOS POR LA VÍA INTRAMUSCULAR. REBUERTO, MARCELA; MONTOYA, LAURA; KREIL, VERÓNICA; AMBROS, LUIS; WAXMAN, SAMANTA; ALBARELLOS, GABRIELA; PRADOS, ANA PAULA; HALLU, RUBEN

Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Chorroarín 280 (1427) Buenos Aires

La cefalexina es una cefalosporina de primera generación con excelente actividad contra cocos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* y estreptococos β -hemolíticos), siendo la MIC₉₀ para aislamientos de origen canino de aproximadamente 2.0 $\mu\text{g/ml}$. Los objetivos de este estudio fueron describir y comparar los perfiles farmacocinéticos de dos preparados comerciales de cefalexina indicados para una administración diaria, inyectados por vía intramuscular (i.m.) a caninos adultos sanos. Seis perros adultos raza beagle (peso 12.7 \pm 3.5 kg) recibieron una dosis de 10 mg/kg de una suspensión oleosa 18% de cefalexina del laboratorio A (preparado A) y del laboratorio B (preparado B) separadas por 3 semanas, por vía i.m. Se obtuvieron muestras de sangre en tiempos predeterminados. Las concentraciones séricas de cefalexina se determinaron por ensayo microbiológico. El análisis no compartimental de los datos de concentración sérica vs. tiempo arrojó los siguientes resultados (media \pm desviación estándar): ABC_{0- ∞} : 72.44 \pm 15.9 y 60.83 \pm 13.2 $\mu\text{g h/ml}$; C_{max}: 10.11 \pm 1.5 y 8.50 \pm 1.9 $\mu\text{g/ml}$; t_{max}: 2.33 \pm 0.5 y 3.0 \pm 0.9 h; vida media de eliminación: 3.56 \pm 1.5 y 2.57 \pm 0.7 h y tiempo medio de residencia: 5.86 \pm 1.5 y 5.36 \pm 1.2 h para los preparados A y B, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre parámetros (prueba de Wilcoxon, $p > 0.05$). El tiempo durante el cual la concentración sérica permaneció por arriba de la CIM, indicador farmacocinético/farmacodinámico de eficacia clínica en antibióticos betalactámicos, fue el 43.72 \pm 9.0 y 40.93 \pm 8.1% del intervalo posológico para los preparados A y B, respectivamente. Se concluye que ambos preparados comerciales presentan un comportamiento farmacocinético similar, por lo cual presentarían similar eficacia clínica.

933. (6996) FARMACOCINÉTICA DE CEFTRIAXONA EN GATOS. ALBARELLOS, GABRIELA; AMBROS, LUIS; KREIL, VERÓNICA; MONTOYA, LAURA; LANDONI, MARÍA (1)

Facultad Ciencias Veterinarias UBA; (1)Farmacología, Facultad Ciencias Veterinarias, UNLP.

Introducción: La ceftriaxona (CFX) es un antibiótico perteneciente al grupo de las cefalosporinas de tercera generación. Sus propiedades farmacocinéticas y dinámicas han sido estudiadas en seres humanos y en algunos animales. Sin embargo su farmacocinética no ha sido caracterizada en gatos. El propósito de este estudio es analizar las curvas de disposición sérica de la CFX después de su administración por las vías intravenosa (IV), intramuscular (IM) y subcutánea (SC) a gatos domésticos. Materiales y métodos: Se utilizaron 5 gatos adultos, con un peso de 5.51 \pm 1.83 kg (media \pm desviación estándar), los que recibieron 25 mg/kg de CFX (Acantex, Roche, Argentina) por vía IV, IM y SC.

Se tomaron muestras de sangre en tiempos preestablecidos durante un período de 24 h. Las concentraciones de CFX se determinaron por el método microbiológico utilizando *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) como microorganismo patrón. Las curvas de disposición plasmática se analizaron por métodos no lineales mediante el programa computarizado P_cNonlin. Resultados (expresados como media \pm desviación estándar): Después de la administración IV, la distribución de CFX fue rápida ($t_{1/2}(d)$ 0.16 \pm 0.06 h) y amplia ($V(d(ss))$ 0.57 \pm 0.22 L/kg). La vida media de eliminación fue de 1.49 \pm 0.32 h, con un tiempo medio de residencia de 1.56 \pm 0.24 h y un Cl_B de 0.37 \pm 0.13 L/h.kg. Después de las administraciones IM y SC, la absorción de la CFX fue alta con valores de biodisponibilidad absoluta de 83.11 \pm 18.48% y 120.60 \pm 37.35%, respectivamente. Los valores obtenidos de T_{max} y C_{max} fueron de: 0.26 \pm 0.04 h y 46.26 \pm 9.09 mcg/ml, y 0.78 \pm 0.40 h y 32.02 \pm 9.39 mcg/ml, para las vías IM y SC respectivamente. El estudio realizado indica que la CFX administrada por las vías IV, IM y SC logra altas y prolongadas concentraciones plasmáticas con una buena biodisponibilidad para las vías IM y SC. Por lo que las tres vías de administración serían apropiadas para el tratamiento de infecciones en gatos domésticos causadas por microorganismos sensibles.

934. (7000) FARMACOCINÉTICA DE ERITROMICINA EN SUERO Y LECHE LUEGO DE SU ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR A CABRAS EN LACTACIÓN. AMBROS, LUIS; KREIL, VERÓNICA; MONTOYA, LAURA; WAXMAN, SAMANTA; ALBARELLOS, GABRIELA; REBUERTO, MARCELA; HALLU, RUBEN; SAN ANDRES, M.(1)

Farmacología, FCV, UBA; (1) Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid.

Introducción: La eritromicina (ERY), es un antimicrobiano perteneciente al grupo de los macrólidos, con espectro sobre cocos y bacilos Gram positivos, micoplasmas y microorganismos anaerobios. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el perfil farmacocinético de ERY, así como su llegada a leche, luego de la administración de una dosis única por vía intramuscular (IM), a cabras en lactación. Materiales y métodos: se utilizaron 6 cabras mestizas en lactación, peso (media \pm desvío estándar) 28.17 \pm 3.31 kg. ERY inyectable solución al 20% (Laboratorio Burnet), dosis 15 mg/kg vía IM. Se tomaron muestras de suero y de leche a tiempos predeterminados durante 12 horas. Las concentraciones de ERY tanto en suero como en leche fueron determinadas mediante el método microbiológico, utilizando *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) como microorganismo patrón. Las curvas de disposición en suero y en leche fueron analizadas utilizando un programa computarizado (P_cNonlin). Resultados: (expresados como media \pm desvío estándar) el tiempo máximo para ERY en leche y en suero fue de 5.00 \pm 1.6 h y 1.96 \pm 0.78 h, respectivamente. La concentración máxima alcanzada fue mayor en leche que en suero (1.2 \pm 0.43 $\mu\text{g/ml}$ y 0.57 \pm 0.15 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente), a su vez el comportamiento de la droga mostró que ésta sufre acumulación en leche, siendo las AUC en leche y en suero de 7.07 \pm 2.24 $\mu\text{g h/ml}$ y 2.94 \pm 0.44 $\mu\text{g h/ml}$, respectivamente y la relación AUC_{leche}/AUC_{suero} de 2.39 \pm 0.59. Dado que las concentraciones inhibitorias mínimas de las bacterias patógenas para ERY se encuentran entre 0.25 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$, los niveles hallados en este estudio sugieren que la administración IM de esta droga sería poco efectiva para el tratamiento de infecciones. Así mismo, aunque bajos, los niveles alcanzados en leche podrían ser perjudiciales en la industria de subproductos lácteos y en la salud humana.

935. (7004) FARMACOCINÉTICA DE LA ERITROMICINA ADMINISTRADA POR VÍA ORAL A CANINOS ADULTOS. ALBARELLOS, GABRIELA ALEJANDRA; WAXMAN, SAMANTA; MONTOYA, LAURA; KREIL, VERÓNICA; AMBROS, LUIS; MONFRINOTTI, AGUSTINA; HALLU, RUBEN; REBUERTO, MARCELA

Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Chorroarín 280 (1427) Buenos Aires

La eritromicina es un antibiótico macrólido con acción eficaz sobre cocos y bacilos Gram-positivos y micoplasmas. Cuando se administra por vía oral su absorción es incompleta y puede ser afectada por factores como su formulación (base o éster) o la presencia de alimento en el tracto digestivo. El objetivo de este estudio fue describir la farmacocinética de dos preparados de eritromicina, suspensión y comprimido, administrados en dosis única a caninos adultos sanos. Seis perros adultos raza beagle (peso 13.5 ± 3.1 kg) recibieron una dosis de 20 mg/kg de etilsuccinato de eritromicina como suspensión al 8% (Pantomicina, Abbott, Buenos Aires, Argentina) o comprimido (500 mg, Pantomicina, Abbott, Buenos Aires, Argentina) separadas por 3 semanas, por vía oral. Se obtuvieron muestras de sangre en tiempos predeterminados. Las concentraciones séricas de eritromicina se determinaron por ensayo microbiológico. El análisis no compartimental de los datos de concentración sérica vs. tiempo obtenidos luego de la administración de la suspensión arrojó los siguientes resultados (media \pm desviación estándar): ABC[(0-inf)]: 0.30 ± 0.13 μ g/h/ml; C[max]: 0.17 ± 0.08 μ g/ml; t[max]: 0.69 ± 0.30 h; vida media de eliminación: 1.53 ± 1.2 h y tiempo medio de residencia: 2.55 ± 1.7 h. Los datos obtenidos luego de la administración de los comprimidos fueron insuficientes como para realizar el análisis farmacocinético. En cuatro animales, tres que recibieron el comprimido y uno que recibió la suspensión, se observaron vómitos y diarreas a partir de los 45 minutos de administrado el preparado. Se concluye que, en nuestras condiciones de estudio, el etilsuccinato de eritromicina se comporta en forma errática administrado por vía oral en el canino.

936. (7013) MODIFICACIONES EN EL METABOLISMO ENANTIOSELECTIVO DE ALBENDAZOLE EN FASCIOLA HEPATICA RESISTENTE A TRICLABENDAZOLE. SOLANA, HUGO DANIEL; RODRÍGUEZ, J.A.; FAIRWEATHER, I.; LANUSSE, C.A.

Lab. Biol. Cel. y Mol.- Dpto. Cs. Biológicas - FCV-UNCPBA; Lab. Farmacol., FCV-UNCPBA, Argentina; Sch. Biol. & Biochem. Queen's Univ. Belfast, UK.

Triclabendazole (TCBZ) es el antihelmíntico benzimidazole (BZD) con mayor actividad sobre el trematode Fasciola hepatica. El desarrollo de resistencia a este fármaco es un inconveniente de alta significancia económica en producción animal. Para el control de trematodes resistentes a TCBZ se utiliza Albendazole (ABZ), otro fármaco BZD de amplio uso en medicina humana y veterinaria. Los BZDs son biotransformados a su metabolito sulfóxido a través de mecanismos de detoxificación propios del parásito. Trabajos previos demostraron que una cepa de F. hepatica resistente (R) a TCBZ posee mayor capacidad metabólica que una cepa susceptible (S). Este hallazgo aportó al entendimiento del fenómeno de resistencia e impulsa a analizar su respuesta frente a otros BZDs. El objetivo del presente trabajo fue evaluar comparativamente en microsomas (MS) de F. hepatica S y R a TCBZ, la sulfoxidación de ABZ y la expresión enantiomérica del metabolito ABZ sulfóxido (ABZSO). Los MS fueron incubados con 40 μ M de ABZ y los metabolitos formados cuantificados por HPLC. Ambas fracciones microsomas (obtenidas de fasciolas S y R) fueron capaces de oxidar ABZ a ABZSO. Sin embargo, esta reacción sulfoxidativa fue marcadamente superior (> 49%) en MS provenientes del trematode resistente. Cuando se analizaron las características de la relación enantiomérica (-ABZSO/+ABZSO) de dicha sulfoxidación se detectó una significativa inversión entre las cepas S y R (S: 1.053 vs. R: 0.914). De la misma forma, el exceso enantiomérico fue mayor en el trematode R (4.6) comparado al S (2.6). Esta inversión de la relación enantiomérica con predominio del enantiómero (+) ABZSO en F. hepatica resistente a TCBZ, demuestra una mayor participación del sistema FMO (generador del enantiómero +ABZSO) y aporta evidencias de que esta vía metabólica podría estar sobreexpresada en el trematode resistente. La implicancia de estos cambios meta-

bólicos en el mecanismo de resistencia en F. hepatica están bajo consideración.

937. (7063) EVALUACION FARMACOLOGICA DE POSIBLES MECANISMOS DE RESISTENCIA A TRICLABENDAZOLE EN FASCIOLA HEPATICA. ¹MOTTIER, L.; ¹SOLANA, H.; ¹VIRKEL, G.; ¹ALVAREZ, L.; ²FAIRWEATHER, I.; ¹LANUSSE, C.

¹Laboratorio de Farmacología, FCV, UNCPBA, Tandil. ²School of Biology, The Queen's University, UK.

El trematode Fasciola hepatica parasita al hombre y los animales domésticos. Triclabendazole (TCBZ) es un antihelmíntico con potente actividad trematodocida tanto sobre estadios inmaduros como adultos. El uso intensivo de TCBZ en áreas endémicas de fascioliasis ha resultado en el desarrollo de resistencia a este compuesto. TCBZ-sulfóxido (TCBZSO) y sulfona (TCBZSO2) son los principales metabolitos recuperados de la circulación sistémica de los animales tratados. Trabajos previos realizados en nuestro Laboratorio, demostraron que TCBZ y sus metabolitos difunden al interior parasitario. Además, la fracción microsomal de F. hepatica puede oxidar TCBZ a TCBZSO. Con el fin de profundizar el conocimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia a TCBZ, los objetivos del presente trabajo fueron comparar en cepas de F. hepatica susceptible y resistente a TCBZ: a) la difusión al interior parasitario de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2, y b) el patrón de biotransformación de TCBZ. Especímenes de F. hepatica susceptible (Cullompton) y resistente (Sligo) a TCBZ fueron incubados (37 °C, 15-180 min.) en KRT buffer con TCBZ, TCBZSO o TCBZSO2 (5 nmol/ml). Microsomas obtenidos de F. hepatica susceptible o resistente a TCBZ fueron incubados (37 °C, 60 min.) con TCBZ (40 μ M). Las concentraciones de TCBZ/metabolitos fueron cuantificadas por HPLC. Menores concentraciones (P<0.05) de TCBZ y TCBZSO fueron detectadas en el interior de F. hepatica resistente a TCBZ. Adicionalmente, se observó una mayor tasa metabólica en la cepa resistente, comparada con la observada en la cepa susceptible a TCBZ. Una menor difusión y/o mayor eflujo de droga sumado a un incremento en la capacidad metabólica podrían explicar las diferencias en susceptibilidad a TCBZ observadas en las cepas de F. hepatica utilizadas en el presente estudio.

938. (7202) ESTUDIO FARMACODINÁMICO DE MELOXICAM EN CANINOS. MONTOYA, LAURA; BRUZZONE, ERNESTO (2); DUCHENE, ADRIANA; PASINA, MIGUEL (2); HALLÚ, RUBEN; SORACI, ALEJANDRO (3)

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires; 2Actividad Privada; 3Facultad de Veterinaria, UNCPBA.

El Meloxicam es un antiinflamatorio no esteroideo, ampliamente utilizado en medicina veterinaria para el tratamiento de patologías inflamatorias crónicas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la posible presencia de efectos colaterales luego de un tratamiento subcrónico con Meloxicam administrado en dosis terapéuticas a caninos durante 39 días. Se utilizaron 8 caninos adultos (2-6 años), mestizos, de 10 a 16 kg, divididos en forma aleatoria en 2 grupos: control (C) y tratamiento (T). Al grupo T se le administró 0.2 mg/kg de Meloxicam (Metacalm suspensión, Boehringer Ingelheim) por día a las 9:00 h. El grupo C recibió un volumen similar de una solución azucarada. Previo a la administración diaria, todos los caninos se evaluaron clínicamente. Se controló la materia fecal diaria mediante un score de clasificación. A los -7, 9, 17 y 39 días se realizaron controles hematológicos (hemograma completo, tiempos de coagulación, bioquímica sanguínea y hepatograma), análisis de orina completo, búsqueda de sangre en materia fecal, biopsia hepática y endoscopia gastroduodenal para la toma de muestras para análisis histopatológico y observación macroscópica de mucosa gástrica. Durante el tratamiento, no se observaron cambios en el grupo C y en los animales del grupo T no se evidenciaron sig-

nos colaterales en el examen clínico general. El score de materia fecal permaneció entre 0-2, sin presencia de sangre por evaluación microscópica. Todos los parámetros hemáticos y urinarios evaluados permanecieron dentro del rango de valores normales. El estudio histopatológico de las muestras tomadas no reveló cambios significativos. Sin embargo, la observación macroscópica de la mucosa gástrica mostró en algunos de los animales congestión y/o petequias con disminución de la motilidad en algunas de las regiones estudiadas para los días 9, 15 y 39 del estudio. Luego de un tratamiento prolongado y a dosis terapéuticas, este estudio demostró que el meloxicam no produciría alteraciones clínicas significativas.

939. (7228) FARMACOCINETICA PLASMÁTICA Y ENDOMETRIAL DE ENROFLOXACINA Y SU METABOLITO DESPUES DE LA ADMINISTRACIÓN INTRA-VENOSA E INTRAUTERINA EN YEGUAS CON ENDOMETRITIS CRÓNICA. 1 GONZALEZ, C.; 1,2 MORENO, L.; 1 FUMUSO, E.; 1,2 SANCHEZ BRUNI, S.

1 Laboratorio de Farmacología, Fac. Cs. Vet., (7000) Tandil - Argentina. 2 CONICET

La endometritis bacteriana es una de las causas comunes de infertilidad en yeguas. El uso racional de drogas antimicrobianas es fundamental para controlar esta patología y por lo tanto es necesario investigar nuevas alternativas terapéuticas. El objetivo del presente ensayo fue evaluar el comportamiento farmacocinético de enrofloxacin (EFX) y su metabolito activo ciprofloxacina (CFX) luego de la administración intravenosa (IV) e intrauterina (IU) en yeguas enfermas. El diagnóstico de endometritis crónica se realizó en diez (10) yeguas. Las yeguas se distribuyeron en dos grupos (n=5) de acuerdo al grado de endometritis. El grupo I se trató con EFX 2,5 mg/kg por vía IV y el grupo II recibió idéntico tratamiento que el grupo I por vía IV. Las muestras de plasma y de tejido endometrial se tomaron durante las 48 h posteriores a la administración. Las muestras se analizaron por HPLC con detección fluorescente. EFX y su metabolito CFX se detectaron por 48 h luego de ambos tratamientos, en ambas matrices. EFX se metabolizó a CFX en una proporción similar (7%) luego de ambos tratamientos. Luego del tratamiento IU, las concentraciones de EFX en el tejido endometrial resultaron un 405% mayores (AUC = 409 µg.h/mL) comparado con el tratamiento IV (AUC = 81.0 µg.h/mL). No se detectaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de EFX después de ambos tratamientos como resultado de una baja absorción uterina del analito (2,66 %). Luego del tratamiento IU, las concentraciones de CFX en el tejido endometrial infectado (AUC=19.2 µg.h/mL) fueron significativamente más altas, que aquellas obtenidas luego del tratamiento IV (AUC=8.70 µg.h/mL). Estos resultados indican que la administración local sería una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de yeguas con endometritis crónica.

940. (7299) INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLICOPROTEÍNA-P: EFECTO SOBRE LA CINÉTICA PLASMÁTICA Y TISULAR DE IVERMECTINA EN RATAS. BALLENT, MARIANA (1,2); LIFSCHITZ, ADRIÁN (1,2); VIRKEL, GUILLERMO (1,2); SALLOVITZ, JUAN M. (1); LANUSSE, CARLOS (1,2)

1. Área Farmacología, Depto. Fisiopatología, FCV, UNCPBA, Tandil. 2. CONICET

La participación de diferentes transportadores celulares de membrana en los procesos de distribución tisular y excreción ha sido demostrada para diversos fármacos. Ivermectina (IVM) es un antiparasitario ampliamente utilizado en medicina humana y veterinaria. La excreción biliar y secreción intestinal de IVM mediadas por glicoproteína-P (gp-P), son los procesos de transporte activo con mayor impacto en la persistencia de actividad antiparasitaria del fármaco. La influencia del sexo en la interacción entre IVM y gp-P, y las consecuencias farmacocinéticas de la misma se evaluó en este trabajo. Cuatro grupos de ratas Wistar machos y hembras (n=15)

recibieron IVM por vía subcutánea (200 µg/kg) sola o co-administrada con itraconazole (ITZ) (intraperitoneal, dos dosis de 5 mg cada 12 h). Tres (3) ratas de cada grupo fueron sacrificadas a diferentes tiempos entre las 6 y 72 h post-administración de IVM, obteniéndose muestras de sangre y del tracto gastrointestinal (GI) para cuantificar la concentración del fármaco por HPLC. La disponibilidad sistémica de IVM fue mayor (P<0.05) (41-89 %) en hembras respecto a los machos en los diferentes tejidos analizados. La co-administración de ITZ produjo un incremento significativo en los perfiles de concentraciones tisulares de IVM en animales de ambos sexos (entre 41 y 101%). Sin embargo, el incremento en el pico de concentración de IVM tras la administración de ITZ fue significativamente mayor en machos (155%) respecto a hembras (40%). Diferencias entre sexos en la expresión y/o actividad de los transportadores como gp-P podrían explicar la menor disponibilidad de IVM y la mayor respuesta a la co-administración de ITZ en las ratas machos. Estos resultados preliminares requieren investigación complementaria.

941. (7307) SECRECIÓN INTESTINAL DE IVERMECTINA MEDIADA POR GLICOPROTEÍNA-P: EVALUACIÓN DE MODULADORES DE DIFERENTE GENERACIÓN. BALLENT, MARIANA (1,2); LIFSCHITZ, ADRIÁN (1,2); VIRKEL, GUILLERMO (1,2); SALLOVITZ, JUAN M. (1); LANUSSE, CARLOS (1,2)

(1) Área Farmacología, Depto. Fisiopatología, FCV, UNCPBA, Tandil. 2. CONICET

Existen evidencias de la participación de transportadores celulares proteicos en los procesos de absorción y excreción intestinal de diversos fármacos. La secreción intestinal mediada por glicoproteína-P (gp-P) aporta significativamente a la elevada tasa de excreción fecal del fármaco antiparasitario ivermectina (IVM). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el proceso de secreción intestinal de IVM mediado por gp-P y el efecto modulador de diferentes sustancias, utilizando la técnica de saco intestinal evertido. Ratas Wistar (machos) fueron utilizadas para la preparación de sacos intestinales (ileon) evertidos. Dichos sacos fueron incubados en un medio de cultivo celular (37 °C, 95% O₂/5% CO₂) entre 5 y 60 min con IVM (3 µM) sola o junto a moduladores de gp-P de diferente generación (10 µM) (itraconazole [ITZ] y PSC833). Concentraciones significativamente mayores de IVM fueron obtenidas en la pared intestinal tras su incubación junto a ambos moduladores de gp-P. La cantidad total de IVM (expresada en AUC) en la pared del ileon fue significativamente mayor tras la incubación en presencia de ITZ (84%) y PSC833 (162 %). La concentración de IVM cuantificada en el interior del saco intestinal fue 63 % (ITZ) y 124 % (PSC833) mayor con respecto a la incubación de IVM sola. Una mayor acumulación en la pared intestinal y un mayor pasaje de IVM al interior del saco intestinal (P<0.05) fueron obtenidos con el agente modulador PSC833 comparado con ITZ. La velocidad de acumulación de IVM en el tejido intestinal fue de 0.24 (PSC833), 0.12 (ITZ) y 0.05 (control) nmoles/g de intestino/min. Diferentes agentes moduladores de la actividad de gp-P tienen efectos diferenciales sobre el transporte intestinal del IVM, lo cual tiene implicancias en la optimización de su potencial terapéutico.

942. (7603) EVALUACIÓN DEL METABOLISMO OXIDATIVO Y REDUCTIVO DE LA DROGA TREMATODICIDA TRICLABENDAZOLE Y SUS METABOLITOS EN OVINOS. VIRKEL, GUILLERMO (1,2); LIFSCHITZ, ADRIAN (1,2); SALLOVITZ, JUAN (1); PIS, ALEJANDRA (1); LANUSSE, CARLOS (1,2)

(1) Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil; (2) CONICET

La actividad antihelmíntica depende del comportamiento farmacocinético y del patrón de biotransformación del fármaco. El metabolismo hepático y extrahepático de diferentes drogas antihelmínticas ha sido estudiado en nuestro laboratorio. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el patrón de

biotransformación hepático y gastrointestinal (ruminal) de la droga trematodocida triclabendazole (TCBZ) y sus metabolitos en ovinos. Microsomas hepáticos ovinos fueron incubados con 40 nmol/mL de TCBZ ó TCBZ sulfóxido (TCBZSO) (1 μ mol/mL NADPH, 37 °C, 30 min). Muestras de fluido ruminal ovino fueron incubadas en anaerobiosis con 40 nmol/mL de TCBZSO ó hidrox-TCBZSO (HO-TCBZSO). Las muestras incubadas fueron preparadas y analizadas por cromatografía líquida de alto rendimiento. TCBZ fue oxidado en TCBZSO y TCBZ sulfona (TCBZSO₂), mientras que TCBZSO fue convertido en TCBZSO₂ por los microsomas hepáticos. Se observó inhibición (P<0.05) de la oxidación cuando ambos sustratos fueron incubados en presencia de metimazole (inhibidor del sistema enzimático flavin monooxigenasa), butóxido de piperonilo y ketoconazole (inhibidores del sistema citocromo P450). TCBZSO e HO-TCBZSO fueron sulforeducidos por el fluido ruminal en TCBZ (droga madre) e hidrox-TCBZ, respectivamente. Ambos sistemas enzimáticos (flavin monooxigenasa y citocromo P450) participan en la oxidación hepática de TCBZ y TCBZSO en ovinos. La microflora gastrointestinal realizó la reducción metabólica (sulforeducción) de TCBZSO e HO-TCBZSO en sus correspondientes tioéteres. Estos resultados son un aporte a la comprensión de los procesos metabólicos involucrados en la eliminación de xenobióticos en rumiantes.

943. (8020) CONCENTRACIONES DE MALONDIALDEHÍDO EN TEJIDOS DE POLLO EN DISTINTOS TIEMPOS DESPUÉS DE UNA DOSIS TERAPÉUTICA DE LEVOFLOXACINA. GARCÍA OVANDO, HUGO; WEYERS, ALICIA; UGNIA, LAURA; ARRIETA, VALERIA; GORLA, NORA

Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, CONICET

Levofloxacin es una nueva fluoroquinolona de tercera generación con escasos estudios farmacológicos y toxicológicos. Otros antimicrobianos análogos, en animales de experimentación, han mostrado capacidad de producir peroxidación de lípidos, proceso que se relaciona con la inducción de varias enfermedades. Los peróxidos lipídicos producen además sabor y olor desagradable en los alimentos. En el presente trabajo se pretende elaborar información sobre las características oxidativas de levofloxacin a través de la determinación de malondialdehído, un marcador de peroxidación lipídica que resulta de la fragmentación de ácidos grasos polinsaturados producida por radicales libres. La determinación se efectuó por cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en pollos de 60 días a los 0,25- 0,5- 1- 2- 12 y 24 h después de la administración de 5 mg/Kg a grupos de 5 animales por tiempo. Se determinaron TBARs en los homogeneizados de hígado, músculo y riñón, previa precipitación proteica, a través de la reacción con TBA en medio ácido a 90°C durante 30 minutos, extracción con butanol y lectura a 535 nm. En músculo, el nivel de MDA en los controles es: 3,75 + 1,28 nmoles/ g de tejido) y en los tratados alcanza un nivel mayor a las 2h de administración del fármaco (6,25 + 1,24 nmoles/ g de tejido) (P menor 0,05) para descender nuevamente a valores normales. En este tiempo y tejido se observa la mayor concentración significativa de MDA entre grupos. En hígado el nivel de TBARs fue mayor 0,25 h después de la administración de una única dosis del fármaco (P mayor 0,05). En riñón no se evidenciaron diferencias importantes en las concentraciones de MDA en el tiempo. Estos resultados preliminares indican una leve capacidad oxidante de levofloxacin. Se pretende evaluar dicha capacidad en tratamientos terapéuticos habituales de dosis repetidas.

INMUNOLOGÍA 14: AUTOINMUNIDAD E HIPERSENSIBILIDAD

944. (7061) CARACTERIZACION ELECTROFIOLÓGICA DE MACROFAGOS ALVEOLARES EN UN MODELO DE

ASMA. ROMERO, Y.; CUENCA, N.; ROMERO, V.; TASAT, D.; AMORENA, C.; GOLDMAN, A.

ECyT, Universidad Nacional de Gral. San Martín

Los macrófagos alveolares (AMs) juegan un rol primordial en la iniciación de la inflamación pulmonar. Agonistas que estimulan macrófagos a liberar especies reactivas del oxígeno (ROS) causan hiperpolarización de la membrana celular (Memb Cell Biol. 2000;13:557). Por otra parte, se ha observado que la actividad de un canal de potasio esta vinculada a la producción de óxido nítrico y el estrés oxidativo en macrófagos activados de *Carassius auratus* (Dev Comp Immunol. 2002;26:445). El objetivo fue caracterizar electrofisiológicamente los AM provenientes de ratones en un modelo de asma desarrollado previamente. La inflamación alérgica se generó por sensibilización ip con OVA (20mg) + Al(HO)[3] (2mg) y desafío por vía aérea con OVA al 3%. La producción de ROS (ensayo de reducción de NBT) y los experimentos de «voltage clamp» en configuración de «whole cell» se realizaron en AMs obtenidos 48 hs post exposición a OVA. En los experimentos de «voltage clamp» se utilizaron las siguientes soluciones: EC: NaCl 140mM, KCl 4mM, CaCl[2] 1mM, MgSO[4] 1.2mM, H[2]PO[4]K 1mM, Hepes 10mM, pH 7.4, Osm 290; IC: NaCl 14mM, KCl 140mM, MgSO[4] 1.2mM, CaCl[2] 10(-7)M, Hepes 10mM, EGTA 5mM, pH 7.2, Osm 290. La producción de ROS en los AMs normales fue 37.64 ± 2.53% (7) y en los «asmáticos» fue 54.2 ± 5.6%(5) (p<0.05). Los resultados de electrofisiología se muestran en la tabla. Se informa: Media ± SEM, (n). ¹p< 0.05 vs normal. Eeq: Potencial de reversión, G: Conductancia, C: Capacitancia total. Las curvas de corriente vs. voltaje de los AM de animales control y «asmáticos» rectificaban hacia afuera.

Eeq (mV) normal	Eeq (mV) asmática	G (nS) normal	G (nS) asmática	C (pF) normal	C (pF) asmática
47± 5(5)	41± 4(5)	1.1± 0.1(5)	4.8± 1.1(5) ¹	13± 2.7(5)	25± 0.5(5) ¹

Las diferencias electrofisiológicas detectadas entre AMs de «asmáticos» y normales podrían estar asociadas a la diferente producción de ROS.

945. (7308) EFECTO DE YOGUR EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMACION INTESTINAL (ENFERM. DE CROHN). GOBBATO, N.M.; RACHID, M.M.; PERDIGÓN, G.

Cátedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT

La enfermedad de Crohn es un proceso inflamatorio intestinal, multifactorial, que involucra factores ambientales y genéticos, dando una respuesta inmune anormal a nivel de mucosa. La microflora intestinal juega un importante papel en el desarrollo de esta enfermedad. Los productos lácteos fermentados son beneficiosos para la salud por su capacidad de modular la respuesta a nivel de mucosa. Demostramos que el yogur ejerce un efecto inmunomodulador a nivel intestinal, inhibiendo el desarrollo del cáncer de colon. Objetivo: estudiar la capacidad inmunomoduladora del yogur sobre un modelo experimental de Enferm. de Crohn. Ratones Balb/c adultos recibieron alimentación previa de yogur durante 10 días consecutivos. Al final del período de alimentación fueron instilados 3 veces por vía rectal con ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS) (20mg/kg) 1 vez por semana y alimentados 10 días cada 2 semanas después de la última instilación. Se obtuvieron muestras semanales. Estudiamos: 1-Recuento y fórmula leucocitaria, hematocrito. 2-Estudio histológico: coloración H-E en intestino delgado (ID) y grueso (IG), IFD para CD4+ y CD8+ y células IgA+ y apoptosis por Tunnel. Resultados: Controles de TNBS presentaron vasodilatación, edema, infiltrado de células inflamatorias y ulceración, leucocitosis (15.000/ul). Los alimentados mostraron un moderado infiltrado a nivel de mucosa y leucocitosis normal (6000/ul). Las células IgA+ aumentaron en ID e IG (175 y 66 cel/10cp) en relación al grupo TNBS (101 y 47cel) Ctr. normal (N)ID: 85 y IG: 30. CD4+ disminuyó en

ID e IG (74 y 40 cel) en relación al control TNBS (95 y 59 respect). NID: 60 y NIG: 30. CD8+ no mostró diferencias en el grupo TNBS y tratado. Las cel.apoptóticas estuvieron aumentadas para el grupo yogur (158 y 150) en relación al grupo TNBS (98 y 80). NID:67 y NIG:45. El yogur favorecería la disminución de la inflamación ya que induciría apoptosis celular y aumento de IgA, Ig antiinflamatoria. La disminución de CD4+ en los alimentados tendría importancia en la producción de citoquinas como demostramos en el modelo de cáncer de colon.

946. (7577) FACTOR REUMATOIDEO EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES). ASOCIACIÓN CON NEFROPATÍA, ANTI-ADN Y ANTI-NUCLEOSOMAS. GALARZA, PABLO; STRADA AGODINO, MARIA LAURA; GRIMAUDDO, SEBASTIAN; MANNI, JORGE; CASELLAS, ANGELA

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM). UBA; Departamento de Inmunología.

Fue sugerido que los factores reumatoideos (FR) puede tener una acción protectora para el desarrollo de la nefropatía en pacientes con LES. Además, los anticuerpos anti-ADNn y anti-nucleosomas estarían involucrados en las alteraciones inmunológicas relevantes en el desarrollo de la actividad en estos pacientes. Se investigó la presencia de FR en pacientes con LES y se evaluó su asociación con la nefropatía y los niveles de anticuerpos anti-ADNn y anti-nucleosoma. Fueron cuantificados los FR utilizando un ensayo de aglutinación pasiva sobre partículas de látex y los anticuerpos anti-nucleosoma y anti-ADNn por ELISAs. Todos los pacientes tuvieron 4 o más criterios diagnósticos para LES con seguimiento en el IDIM. Se evaluaron 57 pacientes con LES, 24 no tenían nefropatía (s/NF) y 33 tenían nefropatía (c/NP). La presencia de altos títulos de anticuerpos anti-nucleosomas (IB>3) fue 34.4 % (11/32) y para anti-ADNn (>300 UI/ml) fue 45.6 % (26/57). Se detectó FR en el 12.3 % (7/57). En los pacientes c/NF se observó una menor positividad para FR que en aquellos s/NF, 6.1% vs 20.8% ($p=0.104$). Al evaluar la presencia simultánea de altos títulos de anticuerpos anti ADNn, anti-nucleosomas y títulos bajos de factor reumatoideo, se observó compromiso renal en el 100 % (6/6) de los pacientes. Mientras que en aquellos que no presentaron estos tres parámetros en forma simultánea solo en el 36 % (9/25) se observó nefropatía ($p<0.01$). En esta serie de pacientes con LES, los resultados revelan una relación significativa entre la ausencia de FR junto a altos títulos de anticuerpos anti-nucleosoma y anti-ADNn con la presencia de compromiso renal.

947. (7586) PERFIL DE PROTEÍNA C REACTIVA (PCR) EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES) Y SU RELACIÓN CON EL COMPROMISO RENAL. STRADA AGODINO, MARIA LAURA; GALARZA, PABLO; GRIMAUDDO, SEBASTIAN; MANNI, JORGE; CASELLAS, ANGELA

Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Médicas «Alfredo Lanari» (IDIM). UBA.

En variadas manifestaciones clínicas los niveles séricos de PCR se elevan acompañando al proceso inflamatorio o de daño tisular. Su asociación con la actividad en el LES es aun controvertida, ya que en estudios transversales se observaron niveles normales durante la exacerbación de la enfermedad. En este estudio fue evaluada la expresión de los niveles séricos de la PCR al comienzo de la actividad renal en pacientes con LES. Se estudiaron 40 pacientes con 4 o más criterios diagnósticos para LES con seguimiento en el IDIM. De ellos, 21 no presentaban compromiso renal (s/NF) y 19 fueron evaluados al inicio de la nefropatía (c/NF). Se determinaron los niveles de PCR mediante un ensayo de aglutinación en partículas de látex y anticuerpos anti-nucleosomas y anti-ADNn utilizando ELISAs. Niveles de PCR >6mg/L (PCR+) se detectaron en 9/21 pacientes s/NF y en 13/19 pacientes c/NF (42,5% vs 68,4%, OR=2,9; IC95%= 0.8 a 10.6;

$p=0.10$). Se observaron valores elevados en forma simultánea para anti-nucleosoma (IB>3) y para anti-ADNn (UI/ml>300) en 2/21 pacientes s/NF y 7/19 c/NF (9,5% vs 36,8%, OR=5,5; IC95%= 1.0 a 31.2; $p=0.04$). Al evaluar la presencia simultánea de estos anticuerpos junto a la PCR se observó en el grupo s/NF 1/9 (11,1%) pacientes PCR- y 1/12 (8,3%) PCR+. Asimismo, en el grupo c/NF 2/6 (33,3%) pacientes PCR- y 5/13 (38,5%) pacientes PCR+. En este grupo de pacientes con LES se observa una concentración muy variable de PCR sérica que no siempre refleja el grado de compromiso renal. Sus valores no acompañan la relación significativa observada entre la presencia simultánea de elevados títulos de anti-nucleosomas y anti-ADNn e inicio del compromiso renal. El LES se caracteriza por una inusual y variable respuesta en los valores de PCR sérica que no siempre refleja la extensión del proceso inflamatorio asociado a la actividad renal.

948. (7590) ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE CITOCINAS PRO- Y ANTI-INFLAMATORIAS EN PACIENTES CON PÉNFIGO. EBERHARD, YANINA; BURGOS, ELISA; VULLO, CARLOS MARÍA; BOROSKY, ALICIA; PESOA, SUSANA; SERRA, HORACIO MARCELO

CIBICI, Conicet, Universidad Nacional de Córdoba; Dermatología, Hospital Nacional de Clínicas, UNC, Córdoba LIDMO, Córdoba

Objetivo: Estudiar si los polimorfismos de los genes de las citocinas TNF-a, TGF- β 1 y IL-10 son factores de susceptibilidad en el desarrollo de Pénfigo. Pacientes, Materiales y Métodos: EL ADN genómico fue obtenido de sangre total de 20 pacientes con Pénfigo (vulgar y foliáceo) y 24 controles normales. Luego el ADN fue amplificado por la técnica de ARMS-PCR. Los polimorfismos estudiados fueron: IL-10 [-1082 (G/A), -819 (C/T)]; TGF β 1 [codón 10 (C/T), codón 25 (G/C)] y TNF-a [-308 (G/A)]. Resultados: Se encontró una frecuencia significativamente alta del haplotipo bajo productor de citocina IL-10 (-1082 A)/IL-10 (-819 T) en los pacientes con Pénfigo cuando fueron comparados con los controles ($p = 0,019$). Esta diferencia fue aún mayor cuando se comparó entre los pacientes con Pénfigo vulgar y controles ($p = 0,015$). Además se observó que entre los pacientes con Pénfigo predominaba el alelo IL-10 (-819 T) cuando se lo comparaba con los controles ($p = 0,009$) y esto se acentuaba cuando comparaban los controles con pacientes con Pénfigo vulgar ($p = 0,008$). No se encontró otras asociaciones entre los pacientes y los controles para ningún otro de los polimorfismos estudiados. La gran frecuencia de portadores del haplotipo bajo productor IL-10 (-1082 A)/IL-10 (-819 T) en los pacientes con Pénfigo sugiere que este polimorfismo podría ser uno de los factores que predisponen al desarrollo de Pénfigo. A pesar de que ningún trabajo ha demostrado correlación entre el alelo IL-10 (-819 T) y producción de dicha citocina, nosotros hallamos prevalencia del mismo en pacientes con Pénfigo. La presencia de este alelo podría estar relacionado con otro factor de susceptibilidad aun no conocido.

949. (7593) NIVELES SÉRICOS DE IGE EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES). CASELLAS, ANGELA; GRIMAUDDO, SEBASTIAN; MANNI, JORGE; INGLESINI, CARLOS

Sección Inmunología. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM). UBA

Un mecanismo de injuria propuesto para las enfermedades autoinmunes es el de hipersensibilidad tipo I. La IgE se une por su receptor de alta afinidad a mastocitos, basófilos y eosinófilos provocando en segundos la degranulación, liberándose histamina almacenada y otros mediadores que producen una importante reacción inflamatoria. Algunos autores asignan un rol patogénico a elevados niveles de IgE en pacientes con enfermedad renal. Se cuantificaron los niveles séricos de IgE en pacientes con LES y se evaluó una posible asociación con el compromiso renal. Se estudiaron 30 pacientes con 4 o más criterios diagnósticos para

LES con seguimiento en el IDIM, sin manifestaciones alérgicas; 8 de ellos con diagnóstico de nefritis lúpica y 32 pacientes con sintomatología alérgica exclusivamente. Se utilizaron 60 sueros controles de pacientes sin manifestaciones alérgicas ni autoinmunes. Para cuantificar la IgE se utilizó un ensayo de ELISA por captura. Mostraron una concentración de IgE >100 UI/ml 12/30 (40.0%) pacientes con LES y 11/32 (34.0%) pacientes con alergia ($p>0.01$). Presentaron niveles de IgE >1000 UI/ml 8/12 (66.7%) pacientes con LES y 1/11 (9.1%) pacientes con alergia ($p<0.01$). Al analizar la distribución de los pacientes en relación a los niveles de IgE, se encontraron concentraciones >1000 UI/ml en 3/6 (50.0%) pacientes con LES sin nefropatía y 5/6 (83.3%) pacientes con nefropatía ($p>0.01$). Este estudio muestra un aumento de la IgE sérica en pacientes con LES en relación a los controles. Los pacientes con valores elevados de IgE fueron principalmente LES y no aquellos con manifestaciones alérgicas. Esta mayor proporción de niveles elevados se encontró en los pacientes con compromiso renal. Es necesario implementar un cuestionario protocolarizado que permita evaluar manifestaciones alérgicas en pacientes con LES y valorar si están o no mediadas por IgE.

950. (7836) LA PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS NKT EN HEPATITIS AUTOINMUNE TIPO I PEDIÁTRICA ES INDEPENDIENTE DE IL-15. DEMERGASSO, MARÍA JULIA; PERIOLO(1), NATALIA; CIOCCA(1), MIRTA(2); VELAZCO, CRISTINA(3); NIVELONI, SONIA(4); MAURIÑO, EDUARDO(4); FAINBOIM, LEONARDO(1); CHERÑAVSKY, ALEJANDRA(1)

Inmunogen.Hosp.Clínicas(1); Hepatol.Hosp.Garrahan(2) ; Hosp.Niños San Justo(3), Int.Delg.Hosp.Gastr.Udaondo(4)

Antecedentes: Tanto el hígado como el intestino delgado constituyen microambientes homeostáticos, tolerantes a antígenos sistémicos y/o dietarios debido a la presencia de citoquinas como IL-15 y de subpoblaciones de linfocitos no convencionales: NT hepáticos («Natural T») o LIEs intestinales (linfocitos intraepiteliales). NT y LIEs son regulados por IL-15. Se sabe que los LIEs están involucrados en la inmunopatogénesis de la enfermedad celíaca. Nuestros resultados previos sugirieron la participación de células NT en la inmunopatogénesis de la hepatitis autoinmune tipo I (HA) [Medicina 62:5(417), 2002]. Objetivos: i) detectar la presencia de NT en el hígado de pacientes con HA, ii) comparar los niveles de expresión de IL-15 en biopsias de pacientes con dichas patologías autoinmunes (HA o EC) y sus respectivos tejidos control. Pacientes y Metodología: 7 pacientes con diagnóstico definitivo de HA, 5 pacientes celíacos, 11 especímenes de hígado control (HC) y 5 biopsias de intestino delgado control (ID). i) Inmunohistoquímica: detección de células Va24+ en secciones finas de biopsias hepáticas incluidas en OCT/N2 líquido (n=3), acMo primario anti-Va24 (Immunotech), kit ABC (Vectastain â elite), 3-3' diaminobencidina y hematoxilina 10%. ii) RT-PCR: determinación del número de transcritos de IL-15/ugb-actina utilizando los plásmidos pMBEK y pQB-1/3 Resultados: evidenciamos la presencia de células Va24+ en el infiltrado portal de biopsias HA. Los niveles de expresión de IL-15 no difieren entre HA y HC pero aumentan significativamente en biopsias EC respecto de ID ($58.8 \pm 12.3 \times 10^7$ vs $9.37 \pm 3.32 \times 10^7$ $p=0.0079$, Mann Whitney U-test). En HA, la ruptura de la tolerancia involucra la participación de células Va24+, aunque a diferencia de lo observado en EC, los niveles similares de expresión de IL-15 detectados sugieren que esta citoquina no modula el daño mediado por dichas células.

951. (7923) LUPUS PEDIÁTRICO FAN NEGATIVO Y ANTI RIBOSOMAL P (A RIB P) POSITIVO. BERTONE, SILVANA; CAMPOS, GUSTAVO; RUSSO, RICARDO; ZELAZKO, MARTA; ROY, ADRIANA

Servicio de Inmunología. Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan. Buenos Aires.

La presencia de múltiples especificidades de autoanticuerpos, es una de las características del LES. Algunos de alta especifici-

dad como el a-Sm y a-DNA, otros asociados a determinadas manifestaciones clínicas y/o actividad de la enfermedad. Los ANA detectados por IFI en células Hep-2 (FAN) por su alta sensibilidad son usados como estudio inicial en todo paciente con sospecha clínica de LES. El objetivo de este trabajo es presentar los hallazgos del laboratorio inmunológico en tres pacientes pediátricos que cumplen los criterios de la ARA para LES y presentaron FAN negativo al debut de la enfermedad y sin tratamiento. Materiales y Métodos: Se presentan 3 pacientes: 1) mujer de 16 años con compromiso renal y manifestaciones neuropsiquiátricas, 2) varón de 10 años con manifestaciones cutáneas y neuropsiquiátricas y 3) mujer de 13 años con trastornos hematológicos y neuropsiquiátricos. Los estudios de laboratorio inmunológico se realizaron con los métodos habituales: IFI sobre Hep-2 para FAN, IFI en Crithidia para a-DNA, nefelometría para C3 y C4, ELISA para a-CL e Immunoblotting para antígenos nucleares extraíbles (ENA). Resultados: Los pacientes presentaron: C3 y C4 disminuidos, FAN negativo en Hep-2 (dil 1/40) con marcado brillo citoplasmático compatible con a-Rib P; a-DNA positivo; a-CL negativo en pac 1 y 2 y positivo en pac 3; a-Sm y a-Rib P positivos. Al realizar diluciones crecientes de los sueros para IFI en Hep-2, en los 3 pac disminuía la intensidad citoplasmática y aparecía la tinción nuclear (1/320-1/640), haciéndose francamente positiva a títulos mayores a 1/2560, 2 con patrón homogéneo y uno moteado. Conclusiones: 1) Estos hallazgos sugieren, que la presencia de anticuerpos a-Rib P pueden «enmascarar» el FAN positivo usando IFI en Hep-2. 2) Siendo el FAN por su sensibilidad el estudio utilizado en la clínica como screening para el diagnóstico de LES, se sugiere realizar diluciones del suero antes de informar su negatividad, cuando hay anticuerpos anti-citoplasmáticos y síntomas sugerentes de enfermedad.

952. (7970) DESÓRDENES INMUNOLÓGICOS ASOCIADOS A ALERGIA A LECHE DE VACA (ALV). CANIL, LAURA (1); CARABAJAL, PATRICIA(2); GOMEZ RACCIO, ANDREA(2); REY, AMANDA(2); BEZRODNIK, LILIANA(2); DOCENA, GUILLERMO(2)

(1) Inmunología Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez Buenos Aires (2) Cátedra de Inmunología Facultad de Ciencias Exactas UNLP

La alergia alimentaria es una respuesta inmunológica adversa a proteínas de alimentos. La prevalencia de ALV en menores de 3 años es de 3-5% y en adultos es de 1%. En el 70-85% de los casos las manifestaciones clínicas son cutáneas, en el 20-25% gastrointestinales. Menos frecuente: trastornos respiratorios y anafilácticos. Objetivo: presentar 4 pacientes (pte) con alteraciones inmunológicas que podrían estar relacionadas con alergia a proteínas de leche de vaca (PLV). Material y Métodos: G.L. de 4 meses de edad, sexo femenino con eccema severo; G.V. de 10 meses de edad, sexo masculino con diarrea y BOR, ambos con hipogamaglobulinemia; G.B. de 4 años, sexo femenino, con Enfermedad Celíaca y L.D. de 17 años, sexo masculino con deficiencia selectiva de IgA (DSA), BOR, infecciones recurrentes severas y secuelas pulmonares. Se determinó en suero IgE total por ELISA de captura, IgE específica a leche de vaca por método EAST, test cutáneos (Prick) a soja, trigo, leche de vaca y huevo y screening serológico para Enfermedad Celíaca. Resultados: Los cuatro pacientes presentaron anticuerpos séricos (IgE específicos a la PLV, IgE total aumentada en 3 pacientes (GL, GV y GB), Prick Test positivos para PLV en 3 pacientes. LD presentó IgE normal, IgE específica y test cutáneo positivo para PLV. En dos de ellos, las manifestaciones clínicas (cutánea y gastrointestinal) mejoraron y los niveles de inmunoglobulinas séricas se normalizaron luego de suprimir la leche de vaca de la dieta. Conclusiones: en 2 ptes con hipogamaglobulinemia y APLV se comprobó una relación directa entre la PLV y manifestaciones clínicas. En niños con hipogamaglobulinemia, en donde se halla descartado una inmunodeficiencia primaria, sería conveniente investigar alergia alimentaria. En el pte con DSA sin otra causa asociada y con una historia de infecciones respiratorias severas, los anticuerpos a PLV podrían contribuir a la patología pulmonar. En la pte con APLV e historia de intolerancia a PLV se diagnosticó Enfermedad Celíaca.

953. (7979) HEPATITIS AUTOINMUNE TIPO I PEDIÁTRICA : EXPANSIÓN OLIGOCLONAL EN EL INFILTRADO DE CÉLULAS MONONUCLEARES. PALADINO, NATALIA (1); PERIOLO, NATALIA (1); FERREYRA SOLARI, NAZARENA (1); GALLOPO, CRISTINA (2); CUARTEROLO, MIRIAM (3); GOÑI, JAVIER (4); FAINBOIM, LEONARDO (1); CHERŇAVSKY, ALEJANDRA (1)

(1) *Inmunogen. Hosp. Clínicas*; (2) *Hepato. Hosp. Gutiérrez*, (3) *Hepat.* y (4) *Transplante hepático Hosp. Garrahan, Buenos Aires*.

El hígado humano es un sitio inmunológico especializado en el mantenimiento de la homeostasis frente a antígenos dietarios y/o periféricos. Posee una heterogénea población de linfocitos T que colaboran activamente en la regulación de dichas funciones. La hepatitis autoinmune tipo I (HA) es una enfermedad de etiología desconocida caracterizada por hipergamaglobulinemia policlonal, presencia de autoanticuerpos en el compartimiento periférico y una respuesta necroinflamatoria hepática progresiva que frecuentemente evoluciona hacia cirrosis y falla hepática. Objetivos: 1) identificar células crónicamente activadas en el hígado de pacientes pediátricos con HA, 2) detectar reordenamientos de la cadena γ del TCR tanto en la lesión hepática como en periferia, que permitan inferir la expansión de uno o pocos clones de LT dominantes. Muestras biológicas: hígado control (HC) proveniente de donantes cadavéricos (n=10), biopsias hepáticas y células mononucleares de sangre periférica -CMSP- de pacientes con HA (n=9). Metod: Detección de células CD45Ro+ en secciones de biopsias incluidas en parafina por inmunohistoquímica. Purificación de ADN por digestión con proteinasa K y extracción fenólica. PCR multiplex con panel de oligonucleótidos de genes variables y de unión de cadenas TCR γ . Control de amplificación: gen DRb1. Electroforesis en geles de agarosa y PAGE. Resultados: El fenotipo de las células infiltrantes del área portal y lobulillar hepática observado es CD45Ro+. Se obtuvo un patrón mono/oligoclonal en 7/9 biopsias HA, y policlonal en 9/9 CMSP y 10/10 HC. El mantenimiento de la hepatitis autoinmune requiere la presencia local de células de memoria crónicamente activadas. A diferencia de otras patologías autoinmunes órgano-específicas, y a pesar de no estar ligada a desórdenes linfoproliferativos, se destacan clones locales dominantes en el infiltrado mononuclear, ausentes en periferia.

954. (8086) PLAQUETAS Y ASMA BRONQUIAL: ANÁLISIS MULTICÉNTRICO RETROSPECTIVO EN PACIENTES CON PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA IDIOPÁTICA CRÓNICA (PTIC). RAIDEN, SILVINA; BALANZAT, ANA; MOLINAS, FELISA; KOHAN, REGINA; FIGUEROA, JUAN MANUEL; GEFFNER, JORGE

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina; Neumonol. Infantil, Hosp. Clínicas; Hematol., Hospital Niños P. Elizalde; Inst. Lanari ; Buenos Aires.

El asma bronquial es un síndrome caracterizado por obstrucción variable y reversible del flujo aéreo, hiperreactividad bronquial e inflamación de la vía aérea. Ha sido sugerida la participación de las plaquetas en su desarrollo, sin embargo, no existen trabajos que hayan estudiado su incidencia en pacientes con disminución en el recuento plaquetario. Realizamos un estudio multicéntrico retrospectivo analizando su incidencia en 210 pacientes con PTIC (recuentos plaquetarios inferiores a $150 \times 10^9/L$ por más de 6 meses). Debido a las dificultades diagnósticas para definir asma bronquial en los niños menores de 6 años, el criterio de inclusión en este grupo etario correspondió a niños con cuadros de sibilancias recurrentes y/o tos persistente en un cuadro clínico compatible con asma de acuerdo a la definición del 3er. Congreso Internacional de Asma Pediátrica, utilizando la expresión Síndrome de Obstrucción Bronquial (SOB), para señalar dichos episodios en este grupo etario. Observaciones: a) la incidencia de asma en pacientes adultos con PTIC fue significativamente menor ($p < 0.01$) que la media poblacional descripta para el país en adultos (2.8% vs 5.0%, respectivamente);

b) la incidencia de SOB en niños menores de 6 años con PTIC fue significativamente menor ($p < 0.01$) que la media poblacional descripta para este grupo etario en el país (8.6% vs 16.4%, respectivamente); c) los pacientes con PTIC nunca desarrollaron cuadro de exacerbación de asma o SOB, con niveles de plaquetas menores a $40 \times 10^9/L$ y d) en todos los pacientes con PTIC, los episodios compatibles con crisis asmática o SOB, siempre se presentaron en el marco de una recuperación significativa en el número de plaquetas en relación a los dos meses previos. Las observaciones realizadas sugieren la existencia de una asociación entre recuento periférico plaquetario y aparición de sibilancias en pacientes con PTIC.

INMUNOLOGÍA 15: INMUNOHEMATOLOGÍA

955. (6822) INFLUENCIA DE LACTOBACILLUS CASEI EN LA RECUPERACIÓN DE ALTERACIONES HEMATOPOYÉTICAS INDUCIDAS POR LA DESNUTRICIÓN. SALVA, S (1); VILLENA, J (2); MEDINA, M (2); AGÜERO, G (2); ALVAREZ, S (1, 2)

(1) *Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), Tucumán*; (2) *Fac de Bioquímica, Química y Farmacia. UNT*

La adición de *Lactobacillus casei* (10^9 cél/d) a una dieta de renutrición (drn) normaliza en 7d la respuesta inmune (RI) de ratones desnutridos, frente a una infección respiratoria con *Streptococcus pneumoniae*. Este efecto se logra con 21d de dieta balanceada (DB). Se estudió la influencia de *L. casei*, adicionado a una drn, sobre la proliferación y diferenciación de células de la sangre, para dilucidar los posibles mecanismos involucrados en la normalización temprana de la RI. Ratones BALB/c desnutridos al destete (D) fueron renutridos 7 y 14 días con: Dieta balanceada (DB) ó DB con *L. casei* (DB+LC). En cada tratamiento se determinó: 1) Peso corporal, 2) Hemograma, 3) Medulograma, 4) % y grado de reactividad de céls peroxidadas positivas (Px), 5) % de céls b-Glucuronidasa positivas (BG+) y a-Naftilbutirato esterasa positivas (ANBE+) en sangre (SP) y médula ósea (MO), 6) Cél CD4+, CD8+ y CD19+ por inmunofluorescencia. Todas las dietas incrementaron el peso de los ratones desnutridos. El nº de leucocitos no llegó al valor normal (N) con ningún tratamiento. En MO hubo un pico en el % de mielocitos (D: 2.7 ± 1.6 ; DB7d: 23.5 ± 0.7 ; DB+LC7d: 28.8 ± 0.8), con mayor incremento de precursores mieloides en el grupo DB+LC7d (N: 6.0 ± 1.2 ; D: 3.0 ± 1.2 ; DB7d: 25.5 ± 0.8 ; DB+LC7d: 40.0 ± 2.1). El % de céls Px intensa, se normalizó con DB+LC14d (N: 57.3 ± 4.5 ; D: 0; DB+LC14d: 50 ± 4.3). Todas las dietas incrementaron el % de céls BG+ en SP, pero en MO el aumento fue significativo cuando se adicionó LC (N: 2.3 ± 0.9 ; D: 0.8 ± 0.1 ; DB: 3.3 ± 1.4 ; DB+LC7d: 7.2 ± 3.1). La desnutrición disminuyó las céls ANBE+ y la adición de LC incrementó su nº, superando al N en SP (N: 27.4 ± 2.5 ; D: 10.7 ± 3.5 ; DB14d: 63.5 ± 5.5 ; DB+LC14d: 85.8 ± 7.6) y en MO (N: 2.5 ± 0.3 ; D: 0.85 ± 0.2 ; DB14d: 2.6 ± 1.2 ; DB+LC14d: 5.8 ± 1.1). Un comportamiento similar se observó en céls CD4+, CD8+ y CD19+. La adición de *L. casei* a una dieta de renutrición induce una mayor proliferación y diferenciación de las series mieloides y linfoides en MO, lo cual facilitaría su rápida y eficiente movilización en presencia de una infección.

956. (6994) CRIOGLOBULINAS: TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIPO DE CRIOGLOBULINA. MOTTA, ESTELA; EXILART, HORACIO

Sección Inmunología y Hematología Clínica. Laboratorio Central. Hospital «Oscar Alende», Mar del Plata.

Objetivo: Determinar el tipo de crioglobulina presente a través de una técnica de inmunofijación, con lavado en frío sin realizar la separación previa de la crioglobulina. Materiales y Métodos: Se analizaron los sueros de tres pacientes con crioglobulinas positivas por tres técnicas distintas: 1. Inmunofijación (IF) 2. Técnica propuesta y 3. Técnica de referencia. La IF del suero se realizó según técnica comercial de Binding Site y Helena. En la técnica

ca de referencia se separa por centrifugación en frío la crioglobulina y luego se realiza la IF convencional. Para la técnica propuesta se utilizaron placas de agarosa y antisueros de Binding Site y Helena, se sembraron 3 ?l de suero en cada calle sin dilución previa y se realizó la electroforesis en heladera a 100v durante 20 minutos. Se lava la placa en solución fisiológica a 4°C durante 24 hs. Posteriormente se seca la placa con papel de filtro y se enfrenta con los distintos antisueros en cámara húmeda durante 30 minutos. Luego se realiza un lavado a 37 °C con solución fisiológica durante 24hs para su posterior coloración. Para conocer el perfil proteico se realizó el proteinograma electroforético. Resultados: En el paciente A en el proteinograma se observa banda homogénea μ/κ en fondo policlonal, en la técnica de referencia y la técnica propuesta se identifica la crioglobulina como banda homogénea μ/κ y policlonal alfa, lambda (crioglobulinemia tipo II). El paciente B muestra un perfil de inmunoglobulinas oligoclonal identificando las crioglobulinas como banda homogénea μ/κ y policlonal gama, alfa y lambda (crioglobulinemia tipo II); el paciente C presenta una gammapatía monoclonal μ/λ , con las técnicas de referencia y propuesta la crioglobulina es identificada como el componente monoclonal μ/λ (crioglobulinemia tipo I) Conclusiones: El método propuesto permite identificar el tipo de crioglobulina sin realizar su separación previa, ofreciendo la ventaja de evitar la pérdida de proteína.

957. (6998) ESTUDIO DE LA ERITROFAGOCITOSIS EN INDIVIDUOS JÓVENES Y ANCIANOS. BIONDI, CLAUDIA; ENSINCK, ALEJANDRA; GARCÍA BORRÁS, SILVIA; RACCA, LILIANA; COTORRUELO, CARLOS; RACCA, AMELIA

Area Inmunología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R.

Se ha demostrado que al aumentar la edad del donante disminuye la fracción eritrocitaria de mayor densidad correspondiente a los Glóbulos Rojos Senescentes (GRSe). En la remoción selectiva de los GRSe además de la fagocitosis directa por acumulación de IgG autóloga en la membrana, se ha propuesto una vía alternativa con participación del ácido siálico. El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de la edad en la interacción entre monocitos y distintas suspensiones eritrocitarias. Se trabajó con muestras de sangre de individuos con edades entre 20 y 40 años (n=50) y mayores de 70 años (n=49). Se prepararon las siguientes suspensiones eritrocitarias: 1) GRSe y GR Jóvenes (GRJ) separados por centrifugación diferencial 2) GR conservados en ACD con (GRcP) y sin plasma (GRsP) durante 6 semanas y 3) GR desialinizados con neuraminidasa (GRNe) y tripsina (GRT). Se realizó el ensayo de eritrofagocitosis enfrentando monocitos isólogos con las suspensiones de GR y se determinó el % de Monocitos Activos (MA). Se usaron controles negativos: GR normales (GRN) y positivos: GR O RhD+ sensibilizados (GRS). Los % de MA obtenidos fueron: a) individuos ancianos: GRSe: 21.9±1.0, GRJ: 2.9±1.2, GRcP(día 35):16.2±1.4, GRsP: 3.1±0.8, GRNe: 11.1±1.3, GRT: 3.2±1.1; b) individuos jóvenes: GRSe:17.1±1.5, GRJ: 3.1±0.9, GRcP(día 35): 11.1±1.1, GRsP: 2.8±1.2, GRNe: 10.8±1.4, GRT: 3.5±1.0; c) Controles: GRN: 2.9±1.3; GRS: 30.5±1.7. La actividad desialinizante de la tripsina no modificó los % de MA. Los valores obtenidos con GRNe fueron superiores a los hallados con GRN (p<0.001), pero similares en individuos ancianos y jóvenes. La pérdida de ácido siálico no aumentaría la destrucción eritrocitaria en individuos ancianos. En cambio, se observó un incremento en los % de MA con GRSe y GRcP (p<0.01) al aumentar la edad del dador. Estos resultados indicarían que la fagocitosis mediada por IgG autóloga sería el principal mecanismo involucrado en el aumento de la destrucción eritrocitaria observada en individuos ancianos.

958. (7231) LA FLUDARABINA INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE IFNG. GAMBERALE, ROMINA; FERNANDEZ-

CALOTTI, PAULA X; GALLETI, JEREMIAS; AMERISE, GRACIELA; GEFFNER, JORGE; GIORDANO, MIRTA

IIHema Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

La fludarabina (FLU) es un análogo de adenosina utilizado en la terapia oncohematológica y que ha comenzado a utilizarse como inmunosupresor. Se ha reportado que la inmunosupresión inducida por la FLU es en parte debida a la disminución específica de STAT1, un factor de transcripción involucrado en la síntesis de IFNg. Dado que el tratamiento in vivo con FLU se asocia con la aparición de fenómenos autoinmunes, nuestro objetivo fue investigar si la FLU produce un desbalance en el perfil de citoquinas TH1/TH2, lo que podría explicar la aparición de autoinmunidad. A tal efecto, realizamos la activación in vitro de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con Ionomicina 10mg/ml y PMA 10ng/ml en presencia o ausencia de FLU y, luego de 24hs de cultivo, evaluamos el porcentaje de células productoras de dichas citoquinas por citometría de flujo. Por otra parte, dosamos la concentración de las mismas por la técnica de ELISA en los sobrenadantes de 48hs de cultivo. Encontramos que la FLU, en dosis subapoptóticas (0,5-2 mM), incrementó no sólo el porcentaje de células productoras de IFNg (n=8, p<0.05), sino también la concentración del mismo en los sobrenadantes de cultivo (n=4, p<0.05). El tratamiento con FLU no modificó la producción de IL-5. Similares resultados fueron obtenidos cuando la activación celular se realizó con PHA (n=8). Otras drogas antineoplásicas, tales como dexametasona, cladribina ó clorambucilo, mostraron efectos opuestos a la FLU, ya que inhibieron marcadamente la síntesis de IFNg. Por último, encontramos que estas dosis de FLU no disminuyen los niveles de STAT1, medida por la técnica de western blot (n=4). Nuestros resultados demuestran que la FLU, en dosis clínicamente relevantes, incrementa la producción de IFNg. Este desbalance hacia el perfil TH1 podría provocar efectos adversos cuando la FLU se emplea como agente inmunosupresor.

959. (7750) REGULACION DIFERENCIAL DEL TRANSPORTADOR DE NUCLEOSIDOS HENT1 EN LINFOCITOS B NORMALES Y LEUCEMICOS. FERNÁNDEZ CALOTTI, PAULA; GAMBERALE, ROMINA; GALMARINI, CARLOS; SÁNCHEZ AVALOS, JULIO; GIORDANO, MIRTA

Laboratorio de Inmunología Oncológica, Academia Nacional de Medicina, Instituto A. Fleming, Buenos Aires. Université Rockefeller, Lyon, Francia.

La fludarabina (Flu) es un análogo de adenosina con actividad proapoptótica utilizado en el tratamiento de la leucemia linfática crónica de células B (LLC-B). Anteriormente habíamos demostrado que la IL-4 aumenta la expresión del transportador de Flu, hENT1 y sin embargo, disminuye la apoptosis inducida por la droga. Dado que la estimulación aguda de la proteína quinasa C incrementa el transporte de nucleósidos a través de hENT1, investigamos si los transportadores inducidos por la IL-4 debían activarse para permitir el ingreso de Flu. Para ello, células LLC-B expuestas durante 24 hs a IL-4 (100 ng/ml) se incubaron 10 minutos con PMA (activador de PKC) (10nM) y finalmente con Flu, evaluándose la apoptosis por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo a 24, 48 y 72 hs. Observamos que la estimulación aguda de la PKC abolió el efecto protector de la IL-4 exacerbando la apoptosis inducida por Flu: células apoptóticas a las 48 hs: Flu: 43%, IL-4+Flu: 24%, PMA: 4%, IL-4+PMA+Flu: 73%, (n=20, p<0.001 IL-4+Flu vs IL-4+PMA+Flu). El inhibidor específico de hENT1, NBTI (100 nM) bloqueó completamente la citotoxicidad por Flu en presencia o ausencia de PMA. El tratamiento agudo con PMA no modificó la actividad anti-apoptótica de IL-8 o interferón alfa en células LLC-B a diferencia de lo observado con IL-4. Estos mismos experimentos se realizaron en linfocitos B normales provenientes de amígdalas en los cuales la IL-4 no aumenta la expresión de hENT1. Encontramos que la activación aguda de PKC no modifica la actividad pro-apoptótica de Flu en

linfocitos B normales (n=6). Nuestros resultados sugieren que la IL-4 induce la expresión de hENT1 no funcionales en células LLC-B, los que son activados por estimulación de PKC, dando por resultado un mayor ingreso de Flu y exacerbación de la apoptosis. En base a estos hallazgos podrían diseñarse nuevas estrategias terapéuticas combinadas para el tratamiento de la LLC-B.

960. (8084) PNA LECTINHISTOQUÍMICA EN MIELOMA MÚLTIPLE IGA. SU POSIBLE RELACIÓN CON LA CLÍNICA. THEILLER, ELVIRA; MINELLA, KIRIAM; SOLIS, EDITA; DE LA VEGA ELENA, DANIEL; CUESTAS, VERONICA

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL. Santa Fe. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Rosario.

La IgA- subclase IgA1- contiene regiones ricas en serinas y treoninas, sitios de potencial O-glicosilación. La cadena oligosacárida O- ligada del glicopéptido comienza con N-acetil galactosamina (Gal-Nac) , que puede unir una galactosa (gal) y formar el disacárido galactosa b 1,3-N-acetilgalactosamina (Gal-GalNac). Nuevas glicosilaciones hacen que, potencialmente, cada uno de estos residuos carbohidratados pueda ligar una molécula de ácido siálico, por lo cual cada molécula de IgA1 puede transportar una mezcla de los posibles tipos de cadenas O-glicosiladas y cada una de ellas puede analizarse por su lectina correspondiente. La glicosilación aberrante que generalmente ocurre en cánceres puede implicar en Mieloma Múltiple (MM) IgA una glicosilación incompleta de la inmunoglobulina, con bajo grado de sialinización y alta expresión del disacárido Gal-GalNac. La lectina de maní (PNA) liga el disacárido Gal-GalNac y se inhibe en forma extrema por ácido siálico. El objetivo del presente trabajo fue investigar la positividad de la inmunoglobulina a la PNA en Mielomas IgA. Sobre frotis medulares de treinta y seis pacientes con MM IgA se realizó lectín histoquímica directa usando PNA marcada con fluoresceína (Vector). En dos pacientes (5,5%), las células plasmáticas malignas mostraron significativa fluorescencia intracitoplasmática para PNA, evidenciando que la inmunoglobulina tenía alto contenido del disacárido Gal-GalNac y una reducida sialilación. La disminución de ácido siálico es de importancia ya que podría tener consecuencias biológicas y clínicas. Dado que el ácido siálico tiene alta carga negativa mientras que los residuos Gal-GalNac son neutros, la desialilación resulta en tendencia a la agregación y depósito de la inmunoglobulina, con activación del complemento y probabilidad de asociación del MM con nefropatía IgA y púrpura de Henoch- Schönlein.

961. (8096) CULTIVO DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES HEMOCLASIFICADORES EN RPMP1 1640. NICOLÓRICH, MARIA VIRGINIA; MAURO, F.; CHIALINA, SERGIO; DE LA VEGA ELENA, DANIEL; SOLIS, EDITA

Servicio de Medicina Transfusional. Hospital Italiano «Garibaldi». Rosario.

Una vez obtenido un hibridoma, debe adaptarse a condiciones de cultivos simples y económicas para disminuir los costos de producción a gran escala. Los medios de cultivo más utilizados son el DMEM y el RPMI-1640 siendo este último de menor costo y más accesible en nuestro medio. El objetivo de este trabajo fue adaptar, al RPMI 1640 suplementado con SFB, dos hibridomas murinos, productores de anticuerpos antieritrocitarios anti-A (título= 128) y anti-B (título= 128) estabilizados en DMEM con Hipoxantina/ timidina. Se seleccionaron por dilución límite, los subclones que generaban título más alto de anticuerpo (A1 y A2 título=512 y 256 resp.) y B1 y B2 (título=512 y 64 resp.). Se cultivaron en placas de 96 wells con un volumen final de cultivo 150ml. a 37°C al 5% de CO₂. La adaptación de los subclones implicó disminuir gradualmente la concentración del medio de cultivo original y aumentar la del RPMI 1640. La adaptación se evaluó determinando diariamente la viabilidad celular con trypan blue, el crecimiento celular por recuento y la producción de anticuerpos

por titulación en medio salino. La proporción de los medios utilizadas (DMEM/RPMI) fue la siguiente: 80/20, 50/50, 30/70 y 0/100. Las células se adaptaron, a cada nueva condición, entre 6 y 7 días para los subclones A1 y A2. Los subclones B1 y B2 se adaptaron en 6 a 7 días para concentraciones de RPMI de hasta el 50% y 13 días para el 70% y 100%. El título de anticuerpo producido por los subclones A1 y A2 adaptados a las nuevas condiciones, fue de 128. Los productores de anti-B, 32 para B1 y 2 para B2. A1 y A2 fueron readaptados a una concentración final del 15% de SFB. Ambos clones pudieron ser adaptados a las nuevas condiciones aunque en el caso de B1 y B2, con una disminución muy importante de rendimiento. Esto es coincidente con la bibliografía en cuanto a que cada hibridoma presenta características únicas en lo que respecta al medio de cultivo y a la adaptación a nuevas condiciones.

INMUNOLOGÍA 16: NEUROINMUNOMODULACIÓN II

962. (6765) DISMINUCIÓN EN LA RESPUESTA LINFO-PROLIFERATIVA LUEGO DE UNA ÚNICA DOSIS DE ANFETAMINA: MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS Y GLUTAMATÉRGICOS IMPLICADOS. ASSIS, MARÍA AMPARO (1); MOTRICH, RUBÉN (2); SOTOMAYOR, CLAUDIA (2); CANCELA, LILIANA (1)

(1) Dpto de Farmacología, (2) Dpto. de Bioquímica. Clínica. Fac. de Ciencias Químicas, UNC

Existe evidencia considerable de que la administración de drogas de abuso compromete la función inmune, aumentando la vulnerabilidad a una amplia variedad de enfermedades. En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que el tratamiento con d-anfetamina (ANF), tanto crónico como agudo, resultó en una disminución dosis-dependiente de la respuesta linfoproliferativa. El objetivo del presente estudio fue determinar la participación de mecanismos dopaminérgicos (DA) y glutamatérgicos en el fenómeno de inmunosupresión inducido por ANF, mediante un pretratamiento con antagonistas selectivos de Re DA D[1] (Sulpiride) y D[2] (SCH23310), así como de Re glutamatérgicos tipo NMDA (MK801). Ratas Wistar macho recibieron un pretratamiento con Sulpiride (60mg/kg IP), SCH23310 (0,1mg/kg IP), MK801 (0,1mg/kg IP) o VEH, 15 min antes de una inyección aguda de ANF (5mg/kg IP). En el día 4 después del tratamiento se evaluó la respuesta linfoproliferativa mediante un cultivo de células de bazo estimuladas con ConA. ANF aguda en dosis de 5 mg/kg inhibió la respuesta proliferativa en un 65%, en concordancia con los hallazgos previos (p<0.05), y el pretratamiento con los antagonistas revirtió este efecto inmunosupresor en todos los casos. Estos resultados señalan que sistemas de neurotransmisores similares a los involucrados en el desarrollo de sensibilización conductual (dopamina y glutamato), participan en los mecanismos de inmunosupresión inducida por ANF. Además, el presente hallazgo extiende nuestras evidencias previas sobre la participación de mecanismos DA en la sensibilización inducida por ANF a los efectos inmunosupresores del estrés sobre las subpoblaciones linfocitarias. Considerando que las drogas de abuso pueden afectar la función inmune, este estudio puede contribuir a la identificación de los mecanismos involucrados. Futuros trabajos determinarán si dicha influencia se produce directa o indirectamente sobre el sistema inmune.

963. (6767) EFECTO A LARGO PLAZO DE ANFETAMINA SOBRE LOS NIVELES DE RNAM, PROTEÍNA Y PÉPTIDOS DERIVADOS DE PROENCEFALINA EN ÁREAS MESOCORTICOLÍMBICAS. ASSIS, MARÍA AMPARO(1); DURÁN, SILVIA (2); ROSETE, MARÍA (2); PADRÓS, MARÍA R. (2); VINDROLA, OSVALDO (2); CANCELA, LILIANA(1)

(1)Departamento de Farmacología, Fac. de Ciencias Químicas, UNC; (2) Lab. de Bioqca. Celular, Universidad Autónoma de Puebla.

Previamente, demostramos que el tratamiento agudo con d-anfetamina (ANF) resulta en efectos inmunosupresores evaluados mediante cultivos de linfoproliferación. Existe evidencia de una estrecha relación entre el sistema nervioso central y el sistema inmune, así como la existencia de numerosos mediadores que participan a ambos niveles incluyendo entre estos a los péptidos opioides y en especial a las encefalinas (ENK). El principal objetivo de este estudio fue determinar, en áreas mesocorticolímbicas de rata, la influencia del tratamiento agudo con ANF sobre: 1) los niveles de ARNm de Pro-ENK mediante RT-PCR; 2) los niveles de Pro-ENK mediante Western Blot, y 3) los niveles de met-ENK, libre y total, mediante RIA. Ratas Wistar macho recibieron una dosis (5mg/kg IP) de ANF, y en el día 4 después del tratamiento, los cerebros fueron removidos para la obtención de las áreas cerebrales de interés. Met-ENK libre aumentó en un 45% y 80% en corteza prefrontal y núcleo accumbens respectivamente ($p < 0.05$), así como el porcentaje relativo de met-ENK libre con respecto a la met-ENK total, mientras que en los niveles de met-ENK total no se observaron diferencias significativas. El ARNm de Pro-ENK aumentó en el tallo cerebral ($p < 0.05$), sin observarse diferencias en las otras áreas. Los resultados del western blot indicaron un aumento significativo de la pro-ENK de 32 kDa en corteza prefrontal y una disminución de la banda de 44 kDa en núcleo accumbens ($p < 0.05$), como consecuencia del tratamiento con ANF. El aumento de ENK observado en estructuras claves en el fenómeno de sensibilización (núcleo accumbens y corteza prefrontal) constituye la primera evidencia de cambios a largo término en este neuropéptido luego de una dosis aguda de ANF. Estos hallazgos son coincidentes con evidencias farmacológicas previas que señalan la participación del sistema opioide en el desarrollo y/o expresión de sensibilización a psicoestimulantes

964. (7367) EFECTO BIFÁSICO DE METHOXAMINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DEL FIBROBLASTO DE PIEL HUMANA. CASANOVA, MARTA; STERIN-BORDA, LEONOR; FURLAN, CÉSAR; BORDA, ENRI

Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, CONICET.

Los receptores adrenérgicos alfa[1] y alfa[1D] fueron caracterizados farmacológicamente con methoxamina estudiando la proliferación celular de fibroblastos humanos. Con radioligandos específicos en membranas celulares fibroblásticas, obtuvimos una unión específica con (3)H-Prazosin (B_{max} : 27,82±7,1 fmol/mg proteínas; K_d : 9,21±0,08 mM). La methoxamina (1x10⁻¹⁰ M a 1x10⁻⁴ M) produjo una acción bifásica sobre la proliferación: 1x10⁻⁹ M expresó máxima estimulación y 1x10⁻⁶ M máxima inhibición. Las dos acciones fueron bloqueadas por el prazosin (1x10⁻⁶ M) y dependientes de la activación de la fosfolipasa C (PLC) con acumulación de fosfoinosítidos (PI). Mientras la calcio/calmodulina (CaM) estaría involucrada en los efectos estimulatorios, la protein-kinasa C (PKC) y la disminución de los niveles de AMP cíclico (AMPC) lo estarían en el efecto inhibitorio. El antagonista selectivo alfa[1D] impidió la inhibición de la proliferación celular sin provocar ninguna modificación en los efectos estimulatorios de methoxamina. Concluimos que la interacción y activación del receptor adrenérgico nativo alfa[1] y el subtipo alfa[1D] puede ser de importancia en el control y modulación del sistema nervioso autónomo (SNA) sobre la proliferación celular del fibroblasto humano de piel.

965. (7405) EFECTOS DE LA EXPRESION CRONICA DE IL-1? EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC). FERRARI, C; CHERTOFF, M; PERRY, H; ANTHONY, D; PITOSI, F

Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires; Department of Pharmacology, University of Oxford, United Kingdom

La interleuquina 1 β (IL-1 β) es una citoquina proinflamatoria asociada con patologías en las que se evidencia fenómenos inflamatorios en el SNC, los cuales se hallan íntimamente liga-

dos a enfermedades neurodegenerativas crónicas, tales como esclerosis múltiple, Alzheimer y Creutzfeld-Jakob. A pesar de que se han estudiado los efectos agudos de esta citoquina en el SNC, no existen estudios sobre los efectos de la expresión a largo plazo sobre la integridad del SNC. El objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos de la expresión crónica de IL-1 β en el SNC. Para ello se utilizó un adenovirus recombinante que expresa IL-1 β inyectado en forma estereotáxica en el estriado de ratas adultas. Las ratas se sacrificaron a los 2, 8, 14, 21 y 30 días y los cerebros se procesaron para histología, inmunohistoquímica, microscopía electrónica o ELISA. La expresión de IL-1 β fue detectable hasta 30 días post-inyección. Entre 8 y 14 días se observó un marcado reclutamiento de neutrófilos, vasodilatación, ruptura de barrera hematoencefálica y activación de microglía y astrogliá entre los días 2 y 14 post-inyección. Además, en el pico inflamatorio, hay una marcada desorganización del tejido en general, caracterizada fundamentalmente por desmielinización observada por Klüver-Barrera y microscopía electrónica. Tanto los oligodendrocitos como las neuronas no presentan alteraciones ultraestructurales. A 30 días luego de la inyección, se observa recuperación del tejido sin presencia de infiltrado y remielinización de las fibras nerviosas. La expresión crónica de IL-1 β , a diferencia de una inyección aguda de la proteína, produce daños reversibles en el SNC, en especial desmielinización transitoria. Por lo tanto, esta citoquina, o algunos de los componentes de su vía, estarían relacionados fundamentalmente con los procesos de desmielinización en la inflamación crónica características de enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple

966. (7449) REGULACIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA LINFOCITARIA POR EL AGONISMO ALFA 2 ADRENÉRGICO. RUBINSTEIN, ROXANA; DAVIO, CARLOS; WALD, MIRIAM

CEFYBO - CONICET; Lab.de Radioisótopos, FFyB-UBA

Es conocido que la funcionalidad del sistema inmune es regulada por el sistema nervioso autónomo. Si bien fue ampliamente estudiada la acción inmunosupresora de la activación beta 2 adrenérgica, poco se conoce de los mecanismos regulatorios ejercidos por la estimulación alfa adrenérgica. En el presente trabajo se estudió la acción del agonismo alfa adrenérgico sobre la reactividad linfocitaria. Se analizó la proliferación inducida por mitógenos selectivos para linfocitos T (LT) o B (LB) en presencia de concentraciones crecientes de agonistas selectivos alfa 1 (cirazolina, Cir) y alfa 2 (clonidina, Clon) adrenérgicos. La Clon (10⁻⁶ M) incrementó (+) la proliferación -medida por incorporación de [3H]timidina- de LT (+59±3 % n=6) y LB (+32±3% n=6). La Cir no afectó la respuesta proliferativa de LT y LB. Al estudiar el efecto del neurotransmisor, noradrenalina (NA), se observó una acción bifásica sobre la proliferación de LT: a bajas concentraciones la estimula (+) mientras que a altas la inhibe (-) (+ 65±4% con NA 10⁻⁸M; -31±5% con NA 10⁻⁵M, n=6). Asimismo, la NA estimuló la proliferación de LB (+52±6% con NA 10⁻⁷M, n=5). Al estudiar las señales intracelulares clásicamente acopladas a la estimulación alfa 2 adrenérgica, la Clon no disminuyó significativamente los niveles de AMPC basales o estimulados. Sin embargo, al determinar la actividad de PKC, la Clon incrementó de forma concentración dependiente dicha actividad, (LT: +83±7% LB: +74±5%; con Clon 10⁻⁶M n=5), actuando de modo sinérgico con el aumento de la actividad enzimática que produce el mitógeno (LT: Con A: +109±15%, Clon+Con A: +183±15; LB: LPS: +80±9, Clon + LPS: +146±8, n=3). Estos resultados describen la existencia de una importante regulación de la respuesta proliferativa linfocitaria mediada por el agonismo alfa 2 adrenérgico, siendo la estimulación de la actividad de PKC uno de los caminos involucrados en mediar el efecto regulatorio observado.

967. (7506) LAS CITOQUINAS NEUROPOYÉTICAS LIF E IL-6 AUMENTAN LA CAPTACIÓN NEURONAL DE NORADRENALINA EN EL HIPOTÁLAMO DE RATA. RODRIGUEZ FERMEPIN, MARTIN; WOLOVICH, TAMARA; BELTRÁN, ANDREA; MINETTO, JULIA; ROSMARIN,

MELANIE; GARBINI, PABLO; GIORDANO, ANDREA; FERNÁNDEZ, BELISARIO E

Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires

En trabajos anteriores describimos la acción de diferentes Factores Neurotróficos (FN) pertenecientes a la familia de las Neurotrofinas sobre la captación y liberación neuronal de noradrenalina en el hipotálamo de rata. Siguiendo esta línea de trabajo, en esta oportunidad estudiamos el efecto de tres FN pertenecientes a la familia de las Citoquinas Neuropoyéticas (CN) como son: el Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), la Interleuquina 6 (IL-) y el Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF), sobre la captación de (3)H-Noradrenalina (NA) tanto en el hipotálamo anterior como en el posterior. Los experimentos se realizaron in vitro utilizando ratas Sprague Dawley de acuerdo a las técnicas previamente descritas (Vatta et al, Regul. Pept. 65,175,1996). Los resultados (expresados como DPM/µg de proteínas) indican que a los 5 minutos el LIF y la IL-6 aumentaron la captación de NA en el hipotálamo posterior ($9.59 \pm 0.91^*$ vs 6.19 ± 0.49 y $7.74 \pm 0.48^{**}$ vs 6.19 ± 0.49 respectivamente, $*p < 0.025$ y $**p < 0.05$ vs Control, $n=8-10$) sin embargo el CNTF no lo modificó. Por otro lado ninguno de los FN modificó la captación de NA en el hipotálamo anterior. El aumento de la captación observado luego de incubar por 5 minutos a los tejidos con las CN, favorecería la teoría de que los FN poseen efectos a corto plazo. Si bien la familia de las CN comparten una de las cadenas del complejo receptor (gp130), el hecho que el LIF y la IL-6 modifiquen la captación de NA y el CNTF no, indicaría que estas CN actuarían a través de sus receptores específicos en el hipotálamo posterior y no sería un efecto inespecífico de las mismas. Las CN podrían modular de manera aguda diversas funciones reguladas por el hipotálamo posterior como ser la presión arterial y secreciones neuroendócrinas comportándose como neuromoduladores inhibitorios de la transmisión noradrenérgica.

968. (7578) I WILL SURVIVE: EL RELOJ BIOLÓGICO Y LA SEPSIS EN HUMANOS Y MODELOS EXPERIMENTALES. SOBRERO, PATRICIO M; MARPEGAN, LUCIANO; KATZ, MARCELO E; SAGARDÍA, JUDITH; RÍOS, FERNANDO; PEZZOLA, EDUARDO; MASKIN, BERNARDO; GO-LOMBEB, DIEGO A.

Laboratorio de Cronobiología, Dpto. de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Bs. As; Servicio de Terapia Intensiva de Adultos, Hospital Dr. Posadas, Buenos Aires.

La fisiología de los mamíferos está sujeta a una variación diaria que es sostenida y regulada por un oscilador interno localizado en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo. El sistema inmune se encuentra regido por esta organización temporal con máximos de actividad en su mayoría durante la fase de reposo. Existen, a su vez, evidencias de que alteraciones en dichas variables son capaces de afectar el funcionamiento del reloj como ocurre en pacientes sépticos en quienes se ha descrito pérdida de algunas funciones circadianas. En nuestro laboratorio hemos hallado que los inmunosupresores modifican los ritmos circadianos de pacientes y modelos animales. En este trabajo examinamos el efecto sobre el reloj biológico de la sepsis en humanos internados en una sala de terapia intensiva y del shock séptico en un modelo animal. La inyección ip de LPS en ratones C57Bl6J produjo una variación significativa en la mortalidad durante la fase de reposo (100%) y la de actividad (36%) ($p < 0.01$, test de Fisher). Los animales que sobreviven recuperan los ritmos circadianos de temperatura corporal y actividad locomotora luego de haberlos perdido durante la fase de sepsis posterior a la administración de LPS. Resultados preliminares sobre 18 pacientes sépticos indican que el 38.9% no presentan variación circadiana de temperatura ni tensión arterial media y el 27.8% tampoco de frecuencia cardíaca. Entre aquellos que presentan ritmos las acrofases y las amplitudes fueron respectivamente $12,26 \pm 6,19$ h y $5,00 \pm 2,57$ °C, $12,39 \pm 6,42$ h y $15,28 \pm 9,83$ mmHg, $11,74 \pm 8,61$ h y $11,70 \pm 4,90$ lat/

min. El hallazgo de la dependencia circadiana de la mortalidad por sepsis y la modulación que ejerce este estado sobre la fisiología hemostática abre una nueva perspectiva en el tratamiento de esta patología y en el conocimiento de la interacción entre el sistema inmune y el reloj biológico.

969. (7815) ROL DEL RECEPTOR NICOTINICO ALFA 7 EN LINFOCITOS HUMANOS. ESANDI, M.C.; DE ROSA, M.J.; GARELLI, A.; RAYES, D.; BOUZAT, C.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

La acetilcolina ha sido caracterizada principalmente como un neurotransmisor del sistema nervioso central y periférico. Se ha demostrado la expresión del sistema colinérgico en células no neuronales, tales como las del sistema inmune. Nuestro objetivo es estudiar al receptor alfa 7 en linfocitos periféricos y determinar su probable rol como inmunoprotector y modulador de la activación de dichas células. Utilizando la técnica de RT-PCR se detectó la presencia de RNAm de la subunidad alfa7 en linfocitos humanos. La expresión fue muy variable entre individuos y en muestras del mismo individuo obtenidas a diferentes tiempos. La incubación de los linfocitos con nicotina (10-100 µM) o con el antagonista alfa-bungarotoxina (BTX) (0.5 µM) produjo sistemáticamente un aumento en la expresión de los alfa 7. Para estudiar si alfa 7 en linfocitos tiene un rol protector similar al descrito en neuronas, se indujo apoptosis con cortisol (10 µM) y se evaluó el grado de apoptosis alcanzado luego de la preincubación con nicotina y BTX, utilizando tinción con DAPI y análisis de fragmentación de ADN. La preincubación con ambas drogas disminuyó el grado de apoptosis inducido por cortisol. Para nicotina se obtuvo un $EC_{50} = 128$ µM. Tanto el agonista como el antagonista podrían estar ejerciendo este efecto protector a través del aumento de expresión del receptor alfa 7. Por otro lado, se estudió el rol del sistema colinérgico en la activación de linfocitos. Para ello los linfocitos fueron incubados simultáneamente con fitohemaglutinina (PHA), a concentraciones subóptimas, y BTX. En presencia del mitógeno el número de células se duplicó, mientras que en presencia de BTX y PHA el número de células se cuadruplicó. Sin embargo, la BTX por sí misma fue incapaz de inducir proliferación en linfocitos. Estos resultados sugieren que receptores nicotínicos alfa 7 están involucrados en la activación de linfocitos y en la protección de la apoptosis inducida por cortisol.

970. (8030) EFECTO DEL ESTRES AGUDO EN EL DESARROLLO DE SHOCK ENDOTOXICO EN RATON. PAPEL DE LA OXIDO NITRICO SINTASA (NOS) EXPRESADA CONSTITUTIVAMENTE EN MACROFAGOS. ORQUEDA, ANDRES JAVIER (1,2); BARREIRO ARCOS, MARIA LAURA (1,2); SILBERMAN, DAFNE MAGALI (1); CREMASCHI, GRACIELA (1,2); GENARO, ANA MARIA (1,2)

(1) Centro Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, (2) Lab Radiosotopos FFyB, UBA

El óxido nítrico generado por la isoforma inducible de la NOS juega un papel fundamental en la cascada de eventos que llevan a la muerte durante el shock endotóxico. La exposición a estrés agudo modula muchos aspectos de la función inmune. Se han descrito tanto efectos protectores como nocivos del estrés agudo en el desarrollo de procesos inflamatorios, aunque los mecanismos involucrados no han sido dilucidados. En particular, el papel de la eNOS expresada constitutivamente en macrófagos (M) no ha sido considerado. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del estrés agudo por inmovilización sobre el curso del shock endotóxico inducido por administración de lipopolisacáridos bacterianos (LPS) en ratones BALB/c. Además analizar la actividad de NOS determinada por formación de (14)C-citrulina en los M peritoneales de estos ratones. Las curvas de letalidad realizadas para un rango de dosis de LPS de 2.4 – 6.4 mg/kg de peso en función del tiempo, mostraron un efecto dual del estrés: protector a altas dosis y nocivo a bajas dosis ($p < 0.05$, $n = 4$). La actividad de NOS en macrófagos controles (N) luego de 4 horas de inyectados con LPS mostró una correlación positiva con la dosis

administrada ($X \pm ES$, pmoles/ 10(7) células, LPS 2.4= 10.3 \pm 2.8, LPS 4.8= 18.1 \pm 2.3, n=4). Esta relación dosis-respuesta se perdió en los ratones estresados (E). El análisis de la expresión de isoformas de NOS por Western-blot, indicó una disminución de la eNOS en los E (píxeles, N=75477 \pm 7329, E=20512 \pm 5422, n=3) y la expresión de la iNOS, ausente en los N. Estos resultados indican que el estrés agudo a través de la modulación de la actividad de eNOS regula la producción de NO inducida por inyección de LPS modificando el curso de la respuesta endotóxica. Los mecanismos moleculares que regulan esta interacción están siendo analizados.

INMUNOLOGÍA 17: INMUNOREGULACIÓN

971. (6884) ACTIVIDAD SISTEMICA Y LOCAL DEL POLISACARIDO QUITOSANO EN TEJIDOS LINFOIDES LUEGO DE LA ADMINISTRACION ORAL. PORPORATTO, CARINA(1); BIANCO, ISMAEL D.(2); CORREA, SILVIA G(3)

Inmunología. CIBICI (CONICET). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba; CEPROCOR

El tipo de respuesta inmune generado en la mucosa intestinal depende de la naturaleza, captación y distribución del antígeno, del microambiente de citoquinas y de la genética del huésped. Quitosano (Q) es un polisacárido catiónico con propiedades naturales para modular la inmunidad en mucosas a través de cambios en la flora intestinal, en el microambiente y en la captación de antígenos. El objetivo de nuestro trabajo fue caracterizar los eventos moleculares que ocurren a nivel local y sistémico luego de la administración oral de bajas dosis de Q. En placas de Peyer (PP), nódulos mesentéricos (NM) y bazo (BZ) de ratas estudiamos 16 hs después de una única dosis de 1 ó 3 mg de Q: (i) la captación y distribución del polisacárido, el fenotipo de células presentadoras de antígenos (CPA) y la activación de linfocitos T y células dendríticas (CD) utilizando citometría de flujo; (ii) la inducción de citoquinas regulatorias IL-10 y TGF-beta por ELISA y RT-PCR y (iii) la expresión de la quimioquina CCL-2 por RT-PCR. En los sitios inductores de la mucosa Q es captado por células CD11b/c+ (macrófagos y CD) y el tratamiento estimula un incremento de CD OX-62+ que aumentan la expresión de antígenos del CMH tipo II ($p < 0.05$) sin cambios en las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86. La captación de Q disminuye hacia la porción distal del intestino. La llegada del polisacárido estimula un aumento significativo en la producción de IL-10 ($p < 0.05$) y en la expresión de RNAm para TGF-beta ($p < 0.05$) en PP. En BZ, la ingesta del polisacárido induce la activación de células CD3+ que aumentan la expresión de los marcadores CD54 ($p < 0.05$) y CD71 ($p = 0.06$) y el incremento de RNAm para CCL-2. En sitios inductores de la mucosa, dosis bajas de Q aumentan el porcentaje de CD inmaduras en un microambiente rico en citoquinas regulatorias. Estos resultados muestran la capacidad de Q de promover un microambiente anti-inflamatorio en mucosa y estimular cambios favorables para la tolerancia y la homeostasis intestinal.

972. (6943) ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA MEDIADA POR RECEPTORES TOLL EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS. VULCANO, MARISA(1,2); DUSI, STEFANO(3); BORRONI, ELENA(2); BADOLATO, RAFFAELE(2); MUSSO, TIZIANA(2); MANTOVANI, ALBERTO(2); SOZZANI, SILVANO(2)

(1)Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires; (2)Instituto Mario Negri, Milán; (3) Univ. de Verona, Italia

La activación de la NADPH oxidasa (estallido respiratorio) presenta un mecanismo esencial en la defensa contra los microorganismos patógenos. Las células dendríticas (DC) son células fagocíticas especializadas en la presentación antigénica pero además, al igual que otras células fagocíticas, tienen la capacidad potencial de secretar moléculas citotóxicas que actúan limitando la diseminación de los patógenos. En este estudio se

observó que DC diferenciadas a partir de monocitos humanos (Mo) expresan los componentes de la NADPH oxidasa y liberan anión superóxido (O₂⁻) en respuesta a ésteres de forbol y a agonistas fagocíticos. La expresión de los componentes p47phox y gp91phox de la NADPH oxidasa disminuye durante la diferenciación de los Mo a DC. La maduración de las DC con moléculas derivadas de patógenos, capaces de activar los receptores de tipo Toll, conduce a un aumento en la expresión de gp47phox y gp91 phox y a un incremento en la liberación de O₂⁻. Se observó, además, que células dendríticas plasmocitoides (P-DC), maduras en presencia de virus influenza, liberan niveles de O₂⁻ comparables a los producidos por las DC mieloides. Por el contrario, la activación de las DC por estímulos inmunes (CD40 ligando) no activa el estallido respiratorio. El estudio de DC de pacientes con enfermedad Granulomatosa Crónica (CGD) demostró que la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) no altera la diferenciación, maduración, producción de quimioquinas ni la capacidad presentadora de las DC. En cambio, se observó que la activación de la NADPH oxidasa es necesaria para que las DC puedan lisar E.coli. Estos resultados sugieren que la regulación selectiva de la producción de IRO por las DC serviría para limitar la diseminación de los patógenos durante el tráfico de estas células hacia los tejidos linfoides secundarios.

973. (7129) COMPLEJOS INMUNES (CI) INHIBEN LA DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS HUMANOS A CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC) CD1A+. ROSSI, LUCAS (1); VANZULLI, SILVIA (2); BEIGIER-BOMPADRE, MACARENA(1); BARRIONUEVO, PAULA(1); ISTURIZ, MARTIN(1); VULCANO, MARISA(1,2)

(1) IHEMA y (2) IEO-FM. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

La interacción de los CI con los receptores para el fragmento Fc de las Igs (FcγR), presentes en las células del sistema inmune, activa diversas funciones efectoras y regulatorias. En este estudio, se evaluó el efecto de los CI sobre la diferenciación de monocitos (Mo) a DC. Para esto, se purificaron Mo a partir de sangre periférica y se cultivaron durante 6 días con IL-4 y GM-CSF en ausencia o presencia de CI adicionados a distintos tiempos del cultivo. El análisis de las células obtenidas en el día 6 demostró diferencias fenotípicas entre las DC diferenciadas en ausencia (DC) y presencia de CI (CI-DC), a saber: CD1a (% \pm SD): 85 \pm 6, 26.7 \pm 9; CD14 (% \pm SD): 24 \pm 10, 45 \pm 8; MHCII (MFI \pm SD): 59 \pm 18, 120 \pm 37; CD68 (MFI \pm SD): 241 \pm 70, 490 \pm 82, para las DC y CI-DC, respectivamente (n=12, $p < 0.05$). Estos resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica y sugieren que los CI impiden la diferenciación de Mo a DC favoreciendo, en cambio, la diferenciación a células con características de macrófagos. Este efecto de los CI es irreversible, dosis-dependiente y de mayor intensidad cuando éstos están presentes desde el día cero del cultivo. Por otro lado, se observó que los CI no alteran el fenotipo de DC ya diferenciadas y no actúan como estímulos madurativos. Funcionalmente, se observó que las CI-DC presentan menor capacidad endocítica, no maduran en respuesta a LPS y producen niveles de IL-12 significativamente menores respecto a las DC ($p < 0.05$). La formación de CI circulantes se produce como una consecuencia fisiológica de la producción de anticuerpos contra antígenos foráneos o como resultado de desórdenes autoinmunes. Cabe señalar que en enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoidea y el lupus, se ha observado una disminución en el número de DC circulantes de estos pacientes. La inhibición de la diferenciación de los Mo a DC por los CI podría, en parte, ser una causa de estas observaciones.

974. (7430) CLONADO Y EXPRESIÓN DE TRANSGLUTAMINASA TISULAR HUMANA (TG2) COMPLETA Y SUS FRAGMENTOS. BAYARDO, MARIELA P; CHIRDO, FERNANDO G.

Cátedra de Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. (1900). La Plata.

Descrita originalmente como el autoantígeno principal detectado en la determinación de anticuerpos antiendomiso, la TG2 adquirió aún más importancia en enfermedad celíaca (EC) al conocerse su participación en la patogenia, principalmente en la generación de epitopes T a partir de péptidos derivados de gliadinas con mayor capacidad de activación de linfocitos T específicos. Los ensayos de serología emplean TG2 humana de fuente natural o recombinante, determinación que presenta alta eficiencia para la detección de EC. El objetivo de este trabajo fue clonar y expresar TG2 humana completa y algunos fragmentos para la caracterización de la reactividad de los anticuerpos séricos de pacientes con EC y estudios de la participación de TG2 en los eventos iniciales de la lesión en la mucosa intestinal. Se obtuvo cDNA a partir de RNAm total de la línea epitelial humana Caco-2. Para el clonado se emplearon primers diseñados sobre la secuencia descrita por Gentile et al. 1991, (Genbank M55153). Además, se emplearon seis juegos de primers que amplifican diferentes regiones del gen de TG2 cuya especificidad se verificó empleando como control un gen de TG2 cedido por la Universidad de Trieste. Los productos amplificados fueron clonados obteniendo fragmentos que corresponden a los dominios Nter, Core, Nter+Core, Core+Cter y Cter. La secuencia obtenida del gen completo de TG2 de Caco-2, de 2064 bases de longitud, fue publicada (Genbank AY675221), y difiere en 11 bases que originan un cambio en 5 aminoácidos respecto a la descrita por Gentile, pero tiene un 100% de identidad con respecto a la secuencia consenso actual. La secuencia fue clonada en el vector de expresión pET30a. Los productos recombinantes obtenidos se analizarán empleando tres anticuerpos monoclonales anti-TG2 producidos en nuestro laboratorio y de los cuales se conoce el epítopo reconocido. En conclusión, se clonó el gen de TG2 completo y fragmentos de interés para el mapeo de la reactividad de anticuerpos séricos de pacientes celíacos y posterior optimización de ensayos serológicos.

975. (7544) EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE MACRÓFAGOS. LISCOVSKY, MIRIAM; MALETTO, BELKYS; ALIGNANI, DIEGO; MORÓN, GABRIEL; PISTORESI-PALENCIA, MARÍA C

Facultad de Cs Químicas-UNC. CIBICI-CONICET. Córdoba

Dada la importancia de los macrófagos como efectores de numerosas funciones de la inmunidad innata y adaptativa, en este trabajo se evaluó la influencia del envejecimiento sobre estas células. Con este objeto se utilizaron células peritoneales totales (CP) y CP enriquecidas en macrófagos por adherencia (MO) pertenecientes a ratones BALB/c de 3 (J) y 18 (V) meses de edad. Por FACS se observó que las poblaciones mayoritarias en CP de ambos grupos son linfocitos B1 y MO, pero la proporción depende de la edad: CP-J (B1=34±4%; MO=38±10%), CP-V (B1=48±4%; MO=17±10%) (p<0.05). Los MO-V con respecto a MO-J mostraron expresión disminuida de CD16/CD32, aumentada del Receptor Scavenger, CD11b y CD86 y similar de CD23, CD69L y MHCII. In vitro, CP totales J y V en estado basal o con estímulo antiinflamatorio (IL4), producen niveles similares de IL10. En condiciones proinflamatorias, CP-V, en comparación a CP-J, secretaron menos NO con LPS (V=22±2; J=34±1 μM), LPS+IFNγ (V=53±5; J=73±2 μM) o CpG+IFNγ (V=39±3; J=51±4 μM). La producción de IL12 también fue menor con CpG (V=65±30; J=153±25 pg/mL) y CpG+IFNγ (V=67±33; J=408±70 pg/mL). En cambio, los niveles de IL10 fueron mayores con CpG+IFNγ (V=10; J=4 ng/mL) y con CpG (V=5; J=4 ng/mL). Por otro lado, MO-V, en comparación a MO-J, secretaron niveles similares de NO con CpG+IFNγ y LPS+IFNγ, y de IL12 con LPS+IFNγ pero la producción fue menor con CpG o CpG+IFNγ (p<0.001). En cambio, la producción de IL10 fue mayor con CPG+IFNγ (p<0.001) o LPS+IFNγ (p<0.03). Los índices de la actividad de la enzima arginasa fueron mayores con IL4 (V=10.6; J=6.8) o LPS (V=6.7; J=3.0). Los resultados obtenidos sugieren que MO-V presentan un fenotipo de activación diferente al de MO-J y responden con mayor actividad de arginasa y mayor secreción de IL-10 (características propias de la activación alterna de MO) pero conservan propiedades de la actividad microbicida como la producción de NO.

976. (7559) MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ENVEJECIMIENTO. ALIGNANI, DIEGO; MALETTO, BELKYS; LISCOVSKY, MIRIAM; BRAILOVSKY, VALENTINA; MORON, GABRIEL; PISTORESI-PALENCIA, MARIA C.

Depto Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. CIBICI-CONICET

Durante el envejecimiento se observa un aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas y menor respuesta a la vacunación. Es por ello que existe el desafío de encontrar adyuvantes efectivos durante este período de la vida. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la inmunización por vía oral o subcutánea (s.c.) utilizando como adyuvante CpG-ODN en ratones BALB/c de 18 (V) meses de edad comparado con animales de 3 meses (J). Células mononucleares de bazo (CMB) y de Placas de Peyer (PP) de ratones normales V estimuladas con ConA produjeron mas INFγ (p<0,05) e IL5 (p<0,05) que CMB y PP de ratones J. Sin embargo, la producción de IL5 fue mucho mayor que la de INFγ con lo cual el balance final de respuesta está desviado hacia TH2. Esto se acompañó con un aumento en ratones V de la población de células T con fenotipo de memoria CD3(+) CD45RB(lo) L-Sele(lo) en bazo (V:50%, J:20%) y PP (V:72%, J:55%) y con mayor expresión del factor de transcripción GATA-3 (Western blot). Interesantemente, la estimulación con ConA de células de ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN mostró un perfil semejante al de los animales no-inmunes. Sin embargo, las mismas células cultivadas en presencia de OVA produjeron IFN-γ (ng/ml: s.c.:V:2,1, J:1,8; oral: V:8, J:12) sin producción de IL-5. Los niveles de anticuerpos, el perfil de isotipos y la respuesta proliferativa específica contra OVA, observada en ratones V después de la inmunización s.c. o vía oral, fue similar a la observada en animales jóvenes. A pesar de las diferencias encontradas en los animales envejecidos no-inmunes, la inmunización por vía oral o s.c. induce en V respuesta específica comparable a la de los animales jóvenes, indicando que CpG-ODN puede ser un adyuvante efectivo durante este período de la vida.

977. (7817) VIRUS-LIKE PARTICLES INDUCE IN VIVO DENDRITIC CELL (DC) ACTIVATION AND TH1-INDUCING CYTOKINE SECRETION. MORON (1), GABRIEL; MAJLESSI (2), LALEH; RUEDA (3), PALOMA; LECLERC (2), CLAUDE

(1) Fac. Cs. Químicas, Univ. Nac. de Córdoba; (2) Institut Pasteur, INSERM, Francia, (3) INGENASA, España.

We have previously established that porcine parvovirus-like virus-like particles (PPV-VLPs) carrying different CD8+ T cell epitopes induce strong antigen-specific CTL responses. Here, we analyzed whether the high immunogenicity of PPV-VLPs is linked to their capacity to activate DCs. Thus, mice were injected i.v. with PPV-VLPs and 15 h later, splenic CD11c+ DCs were purified by positive magnetic selection. DCs purified from PPV-VLPs-injected mice displayed an increased expression of MHC class I and II, CD40, CD80 and CD86 molecules. Both CD8+ and CD8- DCs sub-populations displayed a comparable phenotype. CD86 expression was maximal 15 h after injection, and started to decrease 24 h after injection. At 72 h, almost all DCs were CD86low. I.v. injection of a dose of LPS at least 200 times higher than the amount contained in PPV-VLPs samples (0.50 EU/mL) or proteinase K-treated PPV-VLPs or PPV-VLPs filtrate (100 kDa cut-off) failed to induce DC activation showing that DCs maturation was not due to LPS, to soluble contaminants or other proteins present in VLPs preparations. Maturation of DCs by PPV-VLPs is T-cell independent, as DCs can mature in CD40-/-, CD4-/- and RAG-/- mice. Furthermore, PPV-VLPs elicit a CD40-independent CTL response without help of CD4+ T cells or B cells. Using macroarray technology, we determined the profile of inflammatory cytokines, chemokines and their receptors expressed by DCs from mice 6 hours after iv PPV-VLPs injection. Over 96 genes studied, 35 were expressed in DCs from untreated controls. DCs from PPV-VLPs-injected mice displayed down-

regulation of IL16 and IL1R2, slight up-regulation of IL6, IL10Ra, IL12Rb2, RANTES, CCR7, IFN γ and TNF α and high up-regulation of CXCL9 and CXCL10. CXCL9 and CXCL10 up-regulation was further confirmed by semi-quantitative RT-PCR and ELISA. These results clearly show that the high capacity of PPV-VLPs to induce a CTL response is mediated by the capacity of PPV-VLPs to activate DCs.

978. (7878) MEDICION DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN EL CONDENSADO DE AIRE ESPIRADO. TATEOSIAN, NANCY; KEHOE WILSON, CATALINA; MAFFIA, PAULO; MAZZEI, JUAN ANTONIO; CHULUYAN, H EDUARDO

Lab de Inmunogenética, Hospital de Clínicas «J.de San Martín», Buenos Aires.

El aire espirado contiene aerosoles y vapores que pueden ser analizados para estudiar procesos fisiológicos y patológicos del pulmón. Estos aerosoles y vapores vehiculizan sustancias que pueden ser recolectados condensando el aire espirado. De esta manera se ha podido detectar la presencia de hidrocarburos, eicosanoides, productos de peroxidación lipídica, amonio, electrolitos, citoquinas, factores de crecimiento, entre otras. Sin embargo, se ha cuestionado la reproducibilidad de los hallazgos, en principio por la utilización de distintos equipos y la baja concentración de las sustancias analizadas. El objetivo de este trabajo fue mejorar la metodología de obtención del condensado de aire espirado (CAE) y a la vez estudiar la presencia de mediadores inflamatorios en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En primer lugar se evaluó la concentración de mieloperoxidasa (MPO), inhibidor secretorio de proteasa leucocitaria (SLPI) e IFN γ , en el CAE obtenido en presencia o ausencia de un carrier (albumina). La recolección de la muestra de CAE en presencia de albumina permitió detectar niveles significativamente mayores para todos los mediadores examinados (MPO $p=0.0004$; SLPI $p=0.016$; IFN γ $p=0.021$). Al comparar la concentración de estos mediadores en el CAE de los pacientes con EPOC con respecto a los controles se observó un aumento significativo de MPO en los pacientes con EPOC (control 0.005 ± 0.0029 , $n=6$; EPOC 0.0235 ± 0.0045 , $n=11$; $p=0.009$); no así para IFN γ o para SLPI. En conjunto estos resultados indican que la utilización de un carrier como la albúmina permite detectar mayores niveles de los mediadores inflamatorios examinados en el CAE. Asimismo, los niveles de MPO en el CAE, podría ser un buen marcador del daño pulmonar presente en los pacientes con EPOC.

979. (7966) THE PROPORTION AND PATTERN OF CYTOKINE SECRETION OF DENDRITIC CELLS (DCS) CHANGE WITH AGE IN MURINE SPLEEN. MORON, GABRIEL; LISCOVSKY, MIRIAM; MALETTO, BELKYS; ALIGNANI, DIEGO; PISTORESINI-PALENCIA, MARIA CRISTINA

Fac. Cs. Químicas, Univ. Nac. Córdoba

During aging, T and B cells change their capacities to react against antigens. No data is available whether DCs could participate on these changes. Here, we analyzed the phenotypic composition and cytokine secretion profile of DCs from aged (18-month old) Balb/c mice. In spleen of aged mice, the proportion and number of CD11c+ cells is reduced 30%, compared to their counterparts in young (3-month old) mice. The proportion of B220+ DCs was increased in spleen of aged mice, whereas no difference was observed in the proportion of CD8a+ or CD4+ DCs. In naïve conditions, no differences in CD86 expression were observed, but DCs from aged mice expressed lower levels of I-Ad molecules. Purified spleen DCs from aged mice, incubated overnight with CpG ODNs (CpG motif-containing oligodeoxynucleotides) or with LPS produced more IL-10 and less IL-12p40 than DCs from young mice. In contrast, we found that in mesenteric lymph nodes (MLN) from aged mice, DCs doubled the percentage observed in MLN from young mice. No phenotypic differences were observed in MLN from aged mice. Additionally, bone marrow (BM) cells from aged mice could generate BM-derived DCs (BMDCs) as effectively as BM

cells from young mice. The proportion of CD11c+ cells in BMDCs from aged mice, generated either in the presence of GM-CSF or Flt3-L, was similar to young counterparts. BMDCs from both ages could equally mature upon stimulation with CpG ODNs. Splenic DCs from aged mice show some changes that could affect the innate and adaptive immune response in spleen.

980. (8005) DETERMINACIÓN DE SLPI EN EL SUERO Y LA SALIVA DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA. SCUBLINSKY, DARIÓ; TATEOSIAN, NANCY; REITERI, ROMINA MACARENA; CAPUCCIO, ANA; MAFFIA, PAULO; FAIBOIM, LEONARDO; CHULUYAN, EDUARDO

Lab. Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Serv. Reumatología, Hospital Francés, UBA

El Inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias (SLPI) es una serpina de 11.7 kDa producida por las células epiteliales, que se halla presente en todas las superficies mucosas del organismo y también en fluidos. El rol de SLPI en distintas patologías autoinmunes no ha sido exhaustivamente estudiado. Por ser la artritis reumatoidea la enfermedad patrón de estudio de autoinmunidad e inflamación, el objetivo de este trabajo fue valorar al SLPI como un nuevo marcador de evolución en la artritis reumatoidea. Para ello se recogió saliva mixta (no estimulada) y suero de 19 pacientes con artritis reumatoidea con criterios ACR 97 y 12 controles sanos o con otras enfermedades articulares; se midió la concentración de SLPI (por ELISA) y de proteínas totales (por BCA). Los valores absolutos de SLPI en saliva de pacientes y controles fueron similares. En cambio se pudo observar una menor concentración de proteínas en la saliva de los pacientes artríticos (610 ± 58 vs 350 ± 26 ; $p < 0.0001$). Al analizar la concentración de SLPI salival con relación a las proteínas totales, se pudo observar una mayor concentración de SLPI en los pacientes con respecto a los controles (11 ± 1.1 vs 17 ± 1.5 ; $p = 0.0035$). Al analizar la concentración sérica de SLPI se observó un aumento de la concentración de SLPI en los pacientes con respecto a los controles (74 ± 7.5 vs 98 ± 4.6 ; $p = 0.01$). En tanto se observó una clara disminución en la concentración de proteínas séricas (1798 ± 44 vs 1559 ± 31 ; $p = 0.0002$) y un significativo aumento en el índice SLPI/proteínas (40 ± 3.2 vs 17 ± 7.7 ; $p = 0.0009$). Estos resultados demuestran: i) que las concentraciones séricas de SLPI se encuentran modificadas en los pacientes con artritis reumatoidea; ii) que existen diferencias en la concentración de SLPI en un órgano clásicamente no considerado como blanco en la enfermedad. En conclusión: la determinación de SLPI en saliva y suero de pacientes con artritis podría ser un marcador de la enfermedad.

981. (8047) NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR EN EL TIMO Y LOS GANGLIOS LINFÁTICOS EN RATONES DEFICIENTE PARA CATEPSINA L. LOMBARDI, GABRIELA (1); BURZYN, DALIA (1); MUNDIÑANO, JULIANA (1); CASTILLO, LILIAN(1); VERCELLI, CLAUDIA (1); COSTA, HÉCTOR (1); MEISS, ROBERTO(2); PIAZZON, ISABEL (1); NEPOMNASCHY, IRENE(1)

(1) ILEX-CONICET, IIHEMA, y (2) Centro de Estudios Oncológicos. Academia. Nacional. de Medicina, Buenos Aires.

Los ratones *nack*, deficientes para catepsina L, presentan una disminución en el porcentaje de linfocitos CD4+ y una marcada adenomegalia. Las poblaciones CD8+ y B220+ están aumentadas en la periferia, correlacionando con aumentos en la exportación tímica de linfocitos CD8+ y en el número de células hematopoyéticas en médula ósea. Investigamos la expresión de glicoproteínas de la matriz extracelular (ECM) en órganos linfoides de estos ratones y sus hermanos catepsinaL+/. En el timo de los ratones deficientes para catepsina L los niveles de expresión de fibronectina, laminina y colágeno tipo I y IV-determinados mediante inmunohistoquímica- están disminuidos, mientras que los ganglios linfáticos de los ratones catepsina L -

/- mostraron un marcado aumento en estos componentes de la ECM. Determinamos por citofluorometría los niveles de expresión de la cadena alfa6 (a6) del receptor de laminina VLA-6 y alfa5 (a5) del receptor para fibronectina VLA-5 en linfocitos T de ganglios linfoides. Los valores se expresan como la media del $\% \pm DS(n)$ en linfocitos CD4+ o CD8+. a6hi en CD4+: 12 ± 5 (catepsina L+?) vs 27 ± 5 (catepsina L -/-) (n=8, p<0.001); a6hi en CD8+: 13.5 ± 1 vs 27 ± 6 (n=8, p<0.001); a5hi en CD4+: 7 ± 3 vs 22.5 ± 1 (n=8, p<0.0001); a5hi en CD8+: 6 ± 2 vs 4.5 ± 1 (n=4 ns). No se observaron diferencias significativas en la expresión de estos receptores entre los timocitos de ratones catepsina L+/? y catepsina L -/-. Estos resultados demuestran por primera vez que la catepsina L es capaz de influenciar la composición de la ECM de los órganos linfoides centrales y periféricos. Postulamos que estas alteraciones podrían tener profundas consecuencias sobre el sistema inmune, influenciando la emigración tímica y alterando los mecanismos homeostáticos que regulan el número de células T en los órganos linfoides periféricos.

NEUROCIENCIAS 10: CELULAR Y MOLECULAR 7 / COGNITIVAS Y PSIQUIATRÍA 2

- 982. (6738) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN FENOTÍPICA DEL GEN HSR (HAND SKILL RELATIVE) EN UNA MUESTRA DE NIÑOS CON ESCOLARIDAD PRIMARIA EN LA RIOJA.** RATTI, SILVIA G.; REARTE, SERGIO; COLLA, MARÍA I.; FUENZALIDA, RAFAEL; MIRANDA, LUIS; OYOLA, ERIKA; ROBLEDO, MARÍA L.; ALVAREZ, EDGARDO O.

Univ Nac Cuyo y Departamento de Investigación, IUCS, Fundación Barceló H., sede La Rioja

Se ha descrito que el gen HSR, controla la expresión del uso de la mano derecha, mecanismos cognitivos y asimetría cerebral. Una alteración en su expresión podría provocar deterioros cognitivos sin afectar la inteligencia. Se ha supuesto que la asimetría cerebral, inferida por el giro del cabello, en personas no diestras seguiría un patrón aleatorio. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el fenotipo del gen en una muestra de niños en La Rioja. Se trabajó con 348 niños escolarizados de 10 a 12 años elegidos de las zonas central y sur de la provincia. Todos ellos fueron evaluados mediante las pruebas de Raven, Lüscher y Bender. Además, se usó el Inventario para el Uso de las Manos de Edimburgo, Detección de Trastornos de la Lectoescritura e inspección del Giro del Remolino del Cabello de la Zona Parietooccipital. Los resultados mostraron que la proporción de giro horario entre diestros y no diestros fue significativamente distinta (89.9% versus 71.4%, diestros horario versus no diestros horario, $p < 0.01$). También se observó que en los niños no diestros, la proporción de giro horario fue significativamente más alta que la de giro antihorario (71.4% Vs 28.6%, Horario Vs Antihorario, $p < 0.05$). En conclusión, los datos apoyan la tesis de dextrorrotación relacionada con el giro horario. Sin embargo, no respaldan la idea planteada por otros autores de una predominancia del 100% de giro horario en diestros y del 50% (aleatoria) en no diestros.

- 983a. (6748) SMELL CHANGES AT INITIAL STAGES OF ALZHEIMER'S DISEASE.** OTERO-LOSADA, MATILDE

Neurociencias. LIS-CONICET. Hosp. de Clínicas. UBA

Disturbances in the sense of smell may be important both clinically and theoretically in Alzheimer's disease. Poor olfactory recognition performance has been detected in various neurodegenerative processes though the neuroanatomical and neurochemical basis for this disturbance are still uncertain while there is an abundance of preclinical and clinical data linking olfaction with acetylcholine. This study aimed to evaluate olfactory functioning early after clinical diagnosis of AD. Groups (age and sex-matched, drug free): AD (68±8 yr, n=11), C (healthy controls) (66±12 yr, n=11). Determinations: I. Olfactory detection threshold

with n-1-butanol (paired comparison, forced choice) to assess peripheral receptors' response. II. Smell Identification (UPSIT, 40 microencapsulated complex odors, forced multiple choice) to evaluate central odor processing using verbal (explicit) memory. III. Odor-odor Recognition-Identification (pure stimuli, forced multiple choice), which is an expression of central odor processing using non-verbal (implicit) memory. Statistical analysis: ANOVA (one-way). SPSS 10.0 (software). Butanol threshold quantification showed no differences between the two groups (12% increase) [F (4.05; 1; 21), p<0.057, N.S.] while UPSIT procedure revealed lower performance in AD than in C (28% decrease of right answers) [F (6.72; 1; 21), p<0.017]. Both AD and C were indistinguishable according to non-verbal identification scores. It must be noticed that a small number of subjects were studied. Explicit memory deficit w/preservation of implicit (olfactory) memory likely suggest exclusive olfactory memory subcircuits (recognition) more resistant to neurodegeneration. Previous work indicates that such olfactory subcircuits would be affected by widespread neurodegenerative damage at later stages of disease. Our results agree w/central (not peripheral) etiology in AD. Doty et al. *Physiol. Behav.* 32: 489-502,1984
Kesslak et al. *Neurobiol Aging* 9(4): 399-403,1988
Otero-Losada M. *Physiol. & Behav.* 78(3): 415-425,2003
Otero-Losada M. *Otolaringológica* 26(1): 48-51,2004
Serby et al. *Am J Psychiatry* 148(3): 357-60,1991

- 983b. (6780) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE COX-2 EN UN MODELO DE DEPRESIÓN EN RATAS.** CASSANO, PAOLA; HIDALGO, ALEJANDRA; ARGIBAY, PABLO

ICBME - Hospital Italiano - Buenos Aires.

Antecedentes: La depresión es una enfermedad altamente discapacitante, en la que se supone un sustrato biológico. Entre otros mecanismos se ha relacionado a los procesos inflamatorios con la enfermedad depresiva, observándose una activación del sistema inmune. En el presente se han relacionado numerosos mediadores asociados en las respuestas inflamatorias en la depresión. Sin embargo, poco se ha trabajado sobre el rol que la síntesis de prostaglandinas podría tener en la misma. Objetivo: investigar la expresión diferencial del gen codificante para la enzima COX-2 y la presencia diferencial de la proteína en el cerebro de ratas adultas tratadas en etapas tempranas de su desarrollo postnatal con clomipramina, un modelo farmacológico de depresión. Materiales y Métodos: Se inyectó Clomipramina en ratas neonatas Wistar desde el día 2 al 17. A los 3 y 6 meses de vida fueron extraídos sus cerebros. Se realizó RT-PCR semicuantitativa del gen COX-2 e inmunohistoquímica. Resultados: No se evidenció una expresión cuantitativamente diferencial del gen COX-2 a través de métodos de biología molecular. A través de métodos de inmunohistoquímica se observaron diferencias significativas en hipocampo ($Z = 5.29$, $p < 0.05$) y en corteza ($Z = 9.67$, $p < 0.05$) de la presencia de la proteína COX-2. Los resultados preliminares aquí obtenidos que relacionan COX-2 con un modelo de depresión ofrecen una interesante línea de investigación en relación a los procesos inflamatorios inespecíficos y la enfermedad depresiva. Esta línea parece interesante debido a la fácil modulación de la síntesis de prostaglandinas a través de diversos fármacos.

- 984. (6844) ANÁLISIS DE LA MEMORIA EN PACIENTES CON EPILEPSIA TEMPORAL CON Y SIN ESCLEROSIS HIPOCAMPAL.** ODDO, SILVIA; SOLIS, PATRICIA; LOMLOMDJIAN, CAROLINA; BRENDA, GIAGANTE; CONSALVO, DAMIAN; SILVA, WALTER; SALGADO, PABLO; D'ALESSIO, LUCIANA; CENTURION, ESTELA; PAPAYANNIS, CRISTINA; KOCHEN, SILVIA

Centro de Epilepsia. Hospital Ramos Mejia e Instituto de Biología Celular y Neurociencias «Prof.Dr. Eduardo De Robertis». UBA. CEFYBO. CONICET.

El síndrome de la epilepsia temporal mesial y esclerosis hipocampal (SETM+EH) presenta déficit de memoria episódica material-específico debido al daño en el sistema hipocampal pro-

ducido por la lesión, asociado a diferentes variables como el tiempo de evolución y la edad de inicio de la enfermedad, la frecuencia de crisis y la politerapia. El objetivo de este trabajo fue investigar el rol de la esclerosis hipocámpal y estas variables como probables factores causales del déficit de memoria, comparando los resultados de la evaluación neuropsicológica en pacientes con SETM+EH y pacientes con epilepsia temporal y lesión no EH. Material y método: Se seleccionaron 121 pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. Se dividieron en 2 grupos: Pacientes con SETM+EH (n=101) y pacientes con lesión temporal no EH (n=20). Se utilizó el siguiente protocolo de evaluación neuropsicológica: WAIS-R (CI), Cuestionario de dominancia manual de Edimburgh, Rey Auditory Verbal Learning Test, List Learning, Copia de la Figura Compleja de Rey, Test de Denominación de Boston, Wisconsin Card Sorting Test, Trail Making Test (A y B) y Fluencia Verbal. Para el análisis de los datos se realizó un test de ANOVA y, con las variables significativas, se realizó un test de chi cuadrado. Resultados: El grupo de pacientes con SETM+EH presentó significativamente mayor tiempo de evolución ($p=0.04$), menor edad de inicio de la epilepsia ($p=0.01$) y mayor déficit de memoria ($p=0.004$) que el grupo de pacientes con lesión temporal no EH. Conclusión: Nuestros hallazgos indican que en los pacientes con SETM+EH, el déficit de memoria estaría relacionado con la presencia de esclerosis hipocámpal y las variables epilépticas consideradas, como ha sido publicado por otros autores.

985. (7140) IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS INFECTADAS POR VECTORES VIRALES PORTADORES DE GENES SENTIDO O ANTISENTIDO PARA NMDAR1, INOCULADOS EN HIPOCAMPO DE RATA. CHELI, V; ADROVER, M; BLANCO, C; CORNEA, A; FERRARI, C; PITOSI, F; EPSTEIN, A; JERUSALINSKY, D

IBCyN - Fac. Medicina, UBA; Anat, FCVet, UBA, Ctr Génét Cel Mol, Univ C Bernard, Francia; ONPRC-OHSU, USA; Inst Fund Leloir, Arg.

Hemos construido vectores virales de tipo amplicon (A), derivados de virus herpes simplex tipo-1, portadores de las secuencias sentido (+) o (-) antisentido para la subunidad NR1 del receptor NMDA y del gen de la green fluorescent protein (GFP). Hemos demostrado su capacidad de infectar células en cultivo e in vivo, expresando los transgenes. En cultivos primarios de neuronas se observó disminución de la expresión de la NR1 endógena por Westernblot, 48 h después de la infección con A-GFP-NR1(-), y un importante aumento de la marca cuando con A-GFP-NR1(+). Las ICQ demostraron la alta eficiencia de transfección cuando los títulos inyectados eran de 10(7)-10(8) amplicones/ml. Cuando fueron inyectados in vivo en hipocampo de rata para evaluar la participación del receptor NMDA en aprendizaje y memoria, observamos que el vector A-GFP-NR1(-) interfirió, tanto en habituación a un ambiente novedoso, como en evitamiento inhibitorio de un choque eléctrico en las patas, mientras que los animales inyectados con A-GFP-NR1(+) no mostraron diferencias con los controles inyectados con A-GFP o con vehículo. Quisimos entonces identificar las neuronas potencialmente involucradas. Se realizaron IHQ en los cerebros de ratas inyectadas con dichos vectores, lo que nos permitió determinar el área y tipo de células afectadas utilizando diferentes marcadores: neuronales, astrocitarios, microgliales y anti-GFP. Se cuantificaron las células por estereología (Metamorph), se identificaron los distintos tipos y se midió el volumen afectado, por microscopía de fluorescencia y confocal. La mayoría de las células transfectadas eran neuronas piramidales de CA y algunas pocas, granulares de GD, de un área restringida bajo el sitio de inyección; unas pocas células gliales (astrocitos) expresaron GFP. Alrededor del 2-3% de las neuronas de la región fueron afectadas, lo que sugiere que son potencialmente responsables de los cambios comportamentales observados.

986. (7187) LA AUSENCIA DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D4 NO ALTERA LA VALORACIÓN DE LA

MAGNITUD DE LA RECOMPENSA. NEMIROVSKY, SERGIO IVAN; RUBINSTEIN, MARCELO

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)

El valor asignado a una recompensa varía de a muchas propiedades: la magnitud, el tiempo de espera anterior a su entrega y la probabilidad de ocurrencia principalmente. Numerosos trabajos han vinculado al sistema dopaminérgico con comportamientos relacionados con y dirigidos a la obtención de recompensas, y ha sido asociado a patologías como la adicción a drogas, la esquizofrenia y el Desorden por Déficit de Atención con Hiperactividad (ADHD), todas las cuales presentan alteraciones en estas conductas. Para estudiar el posible rol del Receptor Dopaminérgico D4 se están desarrollando en nuestro laboratorio diversos protocolos de condicionamiento operante en los que ratones con una mutación nula en este receptor deben realizar diversas tareas para obtener una recompensa comestible. Entre ellos, la tarea de Elección de una Recompensa Retrasada en el Tiempo (Choice for Delayed Reward) es vital para determinar los aspectos cognitivos de la impulsividad. En el entrenamiento previo a esta tarea, el individuo debe formar un criterio de elección entre dos recompensas de distinta magnitud. Los ratones deficientes en el Receptor D4 no presentan diferencias respecto al patrón de elección de sus controles, tanto en la proporción en que eligen la recompensa mayor como en la latencia a tomar la decisión. Estos resultados indicarían que los ratones mutantes no tienen alterada la percepción de la magnitud de la recompensa. Diferencias en este valor pueden surgir en etapas posteriores del entrenamiento, cuando la entrega de la recompensa sea retardada en el tiempo.

987. (7422) REGULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH POR APOTRANSFERRINA EN DOS LÍNEAS CELULARES OLIGODENDROGLIALES. ROFFE, MARTIN; PAEZ, PABLO; GARCÍA, CORINA; SOTO, EDUARDO; PASQUINI, JUANA

Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires,

En el SNC la apotransferrina (aTf) actúa como factor trófico y es producida por los oligodendrocitos (OLGs). La adición de aTf al medio de cultivo promueve la diferenciación de dos líneas oligodendrogiales, N19 y N20.1 (Paez y col., 2004), las cuales representan estadios diferentes en la maduración del OLG (Verity y col., 1993). Notch es una proteína transmembrana tipo I. Recientemente ha sido descrito que regula la diferenciación de células precursoras oligodendrogiales (OPCs) (Wang y col., 1998). El mecanismo de activación del receptor por sus ligandos es a través de una proteólisis intramembrana regulada que involucra a la enzima g-secretasa, liberando así un fragmento intracelular, el cual transloca al núcleo donde modula la expresión de determinados genes. La activación de Notch1 por sus ligandos Jagged1 o Delta previene la diferenciación de OPCs (Givogri y col 2003). F3/Contactina, otro ligando funcional de Notch, promueve la diferenciación de OPCs, actuando por un mecanismo intracelular distinto al de los ligandos anteriores (Hu y col 2003). En el presente trabajo hemos estudiado la modulación de la expresión de Notch1, Notch2, Delta y F3/Contactina en presencia de aTf en las células N19 y N20.1. Encontramos que un tratamiento de 3 días con aTf en las células N19 (fenotipo inmaduro), produjo una disminución de Notch1 tanto en su ARNm como en la proteína, conjuntamente con un aumento de F3/Contactina y una disminución de Delta. En esta línea celular no se detectó Notch2. Por el contrario, en las células N20.1 (fenotipo más maduro) la aTf no indujo cambios en la expresión de Notch1, pero produjo una disminución de Notch2, un aumento de F3/Contactina y de Delta. Estos resultados sugieren que la aTf podría estar modulando la vía de señalización de Notch, modificando la expresión del receptor y/o de sus ligandos, como parte de su acción prodiferenciante sobre los OLGs, y que la misma sería dependiente del estado madurativo de la célula.

988. (7688) INHIBICIÓN DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO NEURONAL ALFA7 POR EL ESTEROIDE HIDROCORTISONA. BORRONI, VIRGINIA; GARBUS, INGRID; BARRANTES, FRANCISCO J.

INIBIBB y Cátedra UNESCO de Biofísica y Neurobiología Molecular. Bahía Blanca.

El receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) es un canal iónico que pertenece a la superfamilia de receptores activados por ligando. En el sistema nervioso central se lo encuentra en dos formas principales: una formada por dos subunidades alfa4 y tres subunidades beta2, y otra formada solo por subunidades alfa7. El AChR neuronal alfa7 (alfa7AChR) posee alta permeabilidad al Ca(2+), alta afinidad por bungarotóxina, y desensibiliza con rapidez. Se ha propuesto que la disfunción de este receptor puede estar asociada a diversas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer. En modelos celulares de esta enfermedad, se observó que ciertos esteroides pueden tener efecto citoprotector. Este efecto se ejercería por medio del alfa7AChR, pero se desconoce a través de qué mecanismos. Los esteroides pueden actuar bloqueando la funcionalidad de AChRs muscular y neuronales. El glucocorticoide hidrocortisona (HC) actúa como un inhibidor no competitivo del AChR muscular, afectando tal efecto la mutación del residuo T(422), ubicado en el dominio transmembrana alfaM4. Dicho residuo se halla conservado en el alfa7AChR. Hemos caracterizado electrofisiológicamente el efecto de la HC sobre el alfa7AChR humano, expresado en la línea celular SH-EP1. Se obtuvieron registros de canal unitario mediante la técnica de patch-clamp en su configuración cell-attached. Encontramos que la HC actúa como un inhibidor no competitivo del alfa7AChR, con una constante de bloqueo de $3.9 \times 10(6) \text{ M}(-1)\text{s}(-1)$. El estudio demuestra que la HC afecta la función del alfa7AChR neuronal, postulándose en forma más genérica que los esteroides puedan ejercer algunos de sus efectos rápidos citoprotectores inhibiendo el influjo de Ca(2+) en neuronas mediante el bloqueo de las corrientes de este canal.

989. (7704) EXPRESION GLIAL DE RECEPTORES PURINERGICOS EN LESIONES ISQUEMICAS DE LA CORTEZA CEREBRAL. CASTAÑEDA, MAURICIO; VILLAR, MARCELO J. ; SUBURO, ANGELA M.

Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral.

Las purinas y pirimidinas extracelulares actúan como mensajeros a través de receptores purinérgicos. Estos se expresan abundantemente en los astrocitos, donde los receptores P2Y1 y P2Y2 propagan ondas de Ca2+. Durante la isquemia los niveles extracelulares de adenosina aumentan unas 100 veces. Por tanto, estudiamos los receptores purinérgicos en lesiones devascularizantes de corteza parietal en ratones C57Bl/6J. Después de craneotomía bajo anestesia, se extirpó una zona de piamadre de 3 mm de diámetro. Los animales fueron sacrificados a los 7, 10 y 15 días, efectuándose detección inmunohistoquímica de receptores P2Y2, P2X1, P2X2 y P2X3 y proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Se analizó la inmunoreactividad en: corteza parietal medial y lateral, corteza temporal, cuerpo caloso e hipocampo, comparándose en cada caso el hemisferio lesionado con el contralateral. En el hemisferio contralateral sólo se detectaron, en todos los períodos, GFAP y P2Y2 en la superficie de la corteza cerebral, en el hipocampo y en el cuerpo caloso. En el hemisferio lesionado se observaron cambios locales en la zona devascularizada, y generalizados que afectaban a todo el hemisferio. En la zona devascularizada, a los 7 días apareció intensa inmunoreactividad para P2Y2 y P2X1, con una reacción menor para P2X2 y P2X3. A los 10 días aumentó GFAP, se mantuvo P2Y2 y se redujo P2X2. 15 días después sólo se detectaban GFAP y P2Y2. La reacción generalizada se manifestó por inmunoreactividad para GFAP, P2Y2, P2X1 y P2X2 en zonas de la corteza ipsilateral alejadas de la lesión. Esta reacción generalizada persistía a los 10 y 15 días, pero sólo para GFAP y P2Y2. Las lesiones devascularizantes produjeron una doble respuesta. Una reacción local, intensa y persistente, que reflejaría la proliferación y

migración de células hacia la zona isquémica. Además, una reacción generalizada, con activación de los receptores purinérgicos en casi todo el hemisferio ipsilateral, tal como ocurre con los genes de respuesta inmediata en otras lesiones corticales.

990. (7722) AXOGENIC EFFECT OF ESTRADIOL IN HYPOTHALAMIC NEURONS INVOLVE MAPK SIGNALING. GOROSITO, SV; CARRER, HF; CAMBIASSO, MJ

Instituto de Investigación Médica M. y M. Ferreyra (INIMEC-CONICET), Córdoba, Argentina.

We have shown that 17-β-estradiol induces a selective enhancement of the growth of axons in male derived hypothalamic neurons in vitro. We also demonstrated that this effect was not exerted through the classical intracellular estrogen receptor but depends on a membrane mechanism in which the tyrosine-kinase receptor B participated. The purpose of the present work was to investigate if the activation of mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway is required for estrogen-induced axon growth. Dissociated hypothalamic neurons taken from male fetuses at gestational day 16 were grown in astroglia-conditioned medium and 17-β-estradiol (E2) 10 nM for 48 h. After 3 h washout, cultures were pulsed with E2, E2 conjugated to bovine serum albumin [17-β-estradiol-6-(O-carboximetil) oxima; E2-BSA] or BDNF and harvested for Western blotting. E2 rapidly induced tyrosine phosphorylation of both extracellular signal regulated kinases 1 and 2 (ERK1 and ERK2). Analysis of the temporal course of MAPK activation showed increased levels of phosphorylated ERK up to 60 min after E2 exposure, with a maximal response at 5-15 min. UO126 (specific inhibitor of MEK 1/2, 25 μM) blocked E2 induced axonal elongation and ERK phosphorylation, confirming the involvement of ERK in the neuritogenic effect of E2. The membrane impermeable construct E2-BSA proved as effective as free E2 to induce ERK phosphorylation and axon elongation, suggesting that E2 exerted its effect through a membrane-associated receptor. These results indicate that ERK signaling is necessary for E2 to induce axon growth and this activation could be mediated by a membrane bound estrogen receptor.

991. (7812) TRANSPORTE RETRÓGRADO AXONAL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL (NGF) CONJUGADO CON QUANTUM DOTS Y VISUALIZADOS A NIVEL DE MOLÉCULAS ÚNICAS. ECHARTE, MARÍA M(1); PIETRASANTA, LÍA I(2); ARNDT-JOVIN, DONNA (1); JOVIN, THOMAS (1)

(1)Centro de Microscopías Avanzadas, FCEyN, UBA; (2)Dpto. Biol. Mol., Inst. Max Planck de Química Biofísica

El factor de crecimiento neuronal (NGF) es un péptido responsable de la regulación, diferenciación y mantenimiento de células neuronales. Es liberado por los tejidos innervados e interactúa con las terminales axónicas. Para promover la supervivencia celular, el NGF transmite una serie de eventos complejos de señalización desde la membrana plasmática del terminal nervioso hasta el núcleo situado en el cuerpo celular. NGF interactúa con dos tipos de receptores transmembránicos: TrkA y p75. Ambos receptores son internalizados y transportados en forma retrógrada dentro de endosomas de señalización1. Sin embargo el mecanismo mediante el cual los complejos NGF-receptor son capaces de deslizarse y transmitir su señal a lo largo del axon/célula es aún tema de discusión. El objetivo de este trabajo es estudiar la cinética y mecanismo de transporte retrógrado del NGF a nivel de moléculas únicas, mediante el uso de sondas específicas y métodos de microscopía cuantitativa. La internalización y tráfico del NGF dentro de las células es monitoreada usando NGF acoplado a biotina y unido a quantum dots (QDs) bioconjugados con estreptavidina. QDs son nanopartículas (<20 nm) de cristales semiconductores con propiedades fluorescentes. Debido a su alta fotoestabilidad y la disponibilidad de una variedad de biomoléculas conjugadas, QDs representan herramientas ideales para la visualización de pro-

cesos biológicos en tiempo real y en células vivas (Lidke y col., Nat Biotechnol. 2004). En base al protocolo de Bronfman y colaboradores (J Neurosci. 2003), hemos modificado el NGF para que contenga por término medio una molécula de biotina por péptido. Utilizando este NGF derivatizado, observamos por microscopía de fluorescencia que los NGF-QDs se unen específicamente a la superficie de células PC12, poniendo en evidencia los procesos de difusión, tráfico e internalización de los complejos a temperatura ambiente.

992. (7818) LAS CÉLULAS GLIALES PROTEGEN A LAS NEURONAS DE RETINA DEL DAÑO OXIDATIVO. INSUA, MARÍA FERNANDA; ROTSTEIN, NORA; POLITI, LUIS

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

El daño oxidativo contribuye a la muerte neuronal en diversas enfermedades neurodegenerativas de la retina. La glia podría tener un rol reparador frente a este daño. En nuestro laboratorio hemos demostrado que el stress oxidativo induce apoptosis en neuronas de retina de rata en cultivo. Los objetivos de este trabajo fueron investigar el efecto del daño oxidativo sobre células gliales de retina y determinar si la glia podría proteger a las neuronas de este daño. Para esto, cultivos puros de células gliales de Müller se trataron con el oxidante paraquat (PQ), generador de anión superóxido. Este tratamiento estimuló la proliferación de la glia, aumentando significativamente marcadores de la progresión del ciclo celular, como la incorporación de bromo-deoxiuridina (BrdU), y la expresión de la ciclina PCNA. El PQ aumentó la expresión de GFAP, filamento intermedio cuya expresión se eleva en la glia ante diversos daños, y disminuyó marcadamente la expresión de CRALBP, proteína marcadora de glías de Müller diferenciadas, sugiriendo la dediferenciación de las mismas. A diferencia de su efecto sobre las neuronas, el daño oxidativo no afectó la viabilidad de la glia, que preservó su integridad nuclear y su funcionalidad mitocondrial. A su vez, la presencia de glia protegió a las neuronas de retina del daño oxidativo. En cultivos neuronales puros, el agregado de PQ provocó la apoptosis de casi 35% de las neuronas amacrinas. En contraste, en co-cultivos neuro-gliales se redujo marcadamente la apoptosis de las neuronas amacrinas luego del tratamiento con PQ, y sólo 20% de las neuronas amacrinas evidenciaron apoptosis. Estos resultados sugieren que el daño oxidativo promueve la proliferación y estimula la dediferenciación de las células gliales, lo que concuerda con el rol de generadora de nuevas neuronas ante procesos degenerativos propuesto para la glia en la retina. A esta posible función reparadora, la glia sumaría una acción protectora, liberando factores capaces de proteger a las neuronas amacrinas de la apoptosis inducida por el daño oxidativo.

993. (7828) INTRODUCCIÓN DE VARIANTES POLIMÓRFICAS HUMANAS EN EL GEN DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D4 DE RATÓN MEDIANTE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN CÉLULAS EMBRIONARIAS. PEPER, MARCELA; GELMAN, DIEGO M.; RUBINSTEIN, MARCELO

INGEBI-CONICET y FCEyN-UBA

El gen humano del receptor de dopamina D4 presenta un alto número de variantes polimórficas en la región codificante. Esta variabilidad alélica, que se encuentra en primates pero no en roedores, se debe a la presencia de un VNTR de 48 pb en el tercer dominio intracitoplasmático. Debido a que este dominio interactúa con proteínas G, es probable que la presencia de distintas variantes polimórficas tenga una relevancia funcional. En la población humana los alelos más frecuentes tiene 2, 4 ó 7 repeticiones de este VNTR codificante. Varios estudios de asociación genética han reportado una correlación entre humanos portadores del alelo con siete repeticiones (D4.7) y la manifestación de déficit de atención con hiperactividad (ADHD). El objetivo de este trabajo es desarrollar ratones mutantes (knockin) portadores de 4 ó 7 repeticiones humanas en reemplazo de las secuencias murinas homólogas a esa región del 3er exón del gen del receptor de dopamina D4 del ratón.

Para ello, construimos dos vectores de reemplazo conteniendo secuencias humanas de D4.4 y D4.7 obtenidas por PCR. Estos vectores se electroporaron en células embrionarias troncales de ratón y seleccionadas en presencia de G418 y ganciclovir. Los clones resistentes fueron amplificados y los eventos de recombinación homóloga fueron detectados por una estrategia inequívoca de Southern blot en los extremos 5' y 3'. La presencia de las repeticiones humanas fue confirmada mediante PCR y posterior hibridación con un primer interno marcado radiactivamente. Obtuvimos clones de células embrionarias troncales en los que se ha logrado reemplazar las secuencias murinas por las repeticiones humanas. Estos clones se están seleccionando mediante fenotipos visuales y análisis cariotípico para ser luego microinyectados en blastocistos C57Bl6/J para la producción de ratones quiméricos.

994. (7119) EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LA NEURO-TRANSMISIÓN GABAÉRGICA EN LA RETINA DE HÁMSTER. JALIFFA, CAROLINA; DE ZAVALÍA, NURIA; KELLER SARMIENTO, MARÍA I.; ROSENSTEIN, RUTH E.

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, UBA

La retina del hámster es un sitio de síntesis activa de melatonina. En trabajos previos demostramos una interacción significativa de la glándula pineal en general y la melatonina en particular con el sistema GABAérgico central. Asimismo, demostramos que el ácido gama-aminobutírico (GABA) aumenta la síntesis retiniana de melatonina. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio retiniano. Dada la coexistencia de GABA y melatonina en la retina del hámster resultó de interés examinar el efecto del metoxiindol sobre el sistema GABAérgico retiniano. Para ello, se analizó el efecto de la melatonina sobre diferentes parámetros de actividad GABAérgica: el turnover de GABA (por el método de radioreceptor), la actividad de glutámico descarboxilasa (GAD) (mediante 1-(14)C-L-glutamato), el influjo y la liberación de GABA (usando ^3H -GABA) y el influjo de Cl^- (utilizando $(36)\text{Cl}^-$). La melatonina (inyección intravítrea, concentración final 10 y 100 nM) incrementó significativamente el turnover de GABA en la retina de hámster (control: $6,95 \pm 0,67$ mel 10nM; $8,92 \pm 0,62$ mel 100nM; $10,03 \pm 1,07$ p<0.05 nmol/mg prot). La inyección de melatonina (100nM) aumentó significativamente la actividad de GAD (control: $5,4 \pm 0,2$, mel: $7,55 \pm 0,53$ nmol/mg prot p<0.01). La melatonina no tuvo efecto sobre la liberación fraccional basal de ^3H -GABA ($4,69 \pm 0,12$ vs $4,73 \pm 0,11$) o estimulada por 50mM de K(+) ($7,23 \pm 0,25$ vs $7,24 \pm 0,31$) y no afectó el influjo de ^3H -GABA. A nivel postsináptico, el metoxiindol aumentó significativamente el uptake de $(36)\text{Cl}^-$ inducido por 10 mM de GABA (845 ± 36 vs 1105 ± 61 $\mu\text{mol/mg prot}$ p<0.001) aunque careció de efecto per se (507 ± 23 vs 555 ± 40 $\mu\text{mol/mg prot}$). Estos resultados indican que la melatonina es un activador del sistema GABAérgico retiniano tanto a nivel pre como postsináptico. Teniendo en cuenta el efecto estimulador del GABA sobre la síntesis retiniana de melatonina, estos resultados podrían sugerir la existencia de un mecanismo de feedback positivo del sistema GABAérgico mediado por el metoxiindol.

NEUROCIENCIAS 11: CELULAR Y MOLECULAR 8 / COGNITIVAS Y PSIQUIATRÍA 3

995. (7100) DISFUNCIÓN DEL REFLEJO BARORRECEPTOR RELACIONADA CON LA DEPRESIÓN EN ADULTOS MAYORES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA DE ORIGEN CORONARIO. GUINJOAN, SM; BERBARA, C; GABRIELLI, MA; VIGO, DE; CABALLER, G; PEREZ DE LA HOZ, R; SAMPO, E; LUNA, MC; CARBAJOSA, L; MARCO DEL PONT, C; FREIRE, C; NICOLA SIRI, LC; CARDINALI, DP; ORTIZ FRAGOLA, A

Departamento de Salud Mental y Unidad Coronaria. Hospital de Clínicas, UBA. F. de Bioingeniería UNER

Fundamentos y Objetivo: La depresión cuando se asocia a insuficiencia cardíaca determina un empeoramiento de su pronóstico por un mecanismo no aclarado. Buscamos estudiar la influencia de los síntomas depresivos sobre la actividad del sistema nervioso autónomo sobre el corazón en adultos mayores con insuficiencia cardíaca descompensada de origen coronario, y compararla con la observada en un grupo de adultos mayores sin enfermedad cardiovascular actual. Método: Análisis espectral de la variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC) en registros de 10 min y escala de depresión clínica de Hamilton de 21 ítems en 25 adultos mayores de 60 años con insuficiencia cardíaca descompensada de origen coronario (79 ± 6 años, 52% mujeres, fracción de eyección del ventrículo izquierdo $45 \pm 11\%$, Hamilton 11 ± 5) y en 19 adultos mayores comparables sin patología cardiovascular aguda. Resultados: Como se ha descrito previamente, los pacientes tuvieron indicadores espectrales de VFC más bajos que los controles. En el grupo de pacientes, la severidad de la sintomatología depresiva estuvo asociada a un deterioro de la VFC de baja frecuencia (LF), indicativa de la modulación del reflejo barorreceptor ($r=-0.42$, $p=0.039$, test de correlación de Spearman). El deterioro de la función barorrefleja relacionada a la presencia de sintomatología depresiva en pacientes con insuficiencia cardíaca de origen coronario puede contribuir a explicar el incremento de mortalidad observado en pacientes con insuficiencia cardíaca y comorbilidad depresiva.

996. (7574) EFECTOS DE LA CASTRACIÓN Y DEL AMBIENTE ENRIQUECIDO (AE) SOBRE LA MEMORIA DE TRABAJO ESPACIAL (MTE) EN RATAS MACHO ADULTAS. TESLER, LEONEL; LORES ARNAIZ, M DEL ROSARIO; GALEANO, PABLO; COSENTINO, ALEJANDRO; TZOIMACHER, DIEGO; GATTARI, ALEJANDRO; KREPLAK, NICOLÁS; DE EZCURRA, MARÍA; ARIAS, PABLO

Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción, Dto de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA y Laboratorio de Memoria y Estrés, Facultad de Psicología, UBA

En ratas macho, la gonadectomía/castración química tienen un efecto negativo sobre la adquisición de MTE; por otro lado, los animales mantenidos en AE mejoran dicha función. Nos planteamos evaluar los efectos del AE sobre la adquisición de MTE en ratas macho castradas, intactas y reemplazadas con testosterona (To). Ratas Sprague Dawley macho de 20 días de edad fueron alojadas en jaulas estándar de 29 x 21 x 34 cm (ambiente común o AC, $n=24$), o en jaulas de 50 x 98 x 54 cm con rampas, galerías y 5 objetos renovados diariamente (AE, $n=24$). A su vez, cada grupo fue dividido en tres subgrupos (I: animales intactos, C: castrados y S: castrados y suplementados con 0,1 mg/kg por semana de una mezcla de sales de To). Tras 15 días se inició una fase de moldeamiento (10 minutos por día, 8 días) en un laberinto radial de 8 brazos con claves visuales externas asignándose a cada rata al azar 4 brazos en los que podía hallar el refuerzo positivo. Siguió una fase de entrenamiento de 6 sesiones diarias, que constaban de dos recorridos: 1) recorrido informativo: dos de los brazos habilitados estaban cerrados por puertas guillotina; 2) recorrido de elección: todos los brazos estaban abiertos y la rata debía entrar en los brazos que antes le estaban vedados. Durante este recorrido cada entrada a un brazo ya visitado en el recorrido informativo se registró como un error de memoria de trabajo. La adquisición de MTE fue definida por la comisión de un error o menos en el último día del entrenamiento. En AC, un % menor de los animales C adquirió la MTE (C: 43% vs. I: 81% vs. S: 81%; $p < 0,05$). Esta diferencia no se observó en las ratas en AE. Concluimos que la castración dificulta la adquisición de MTE en condiciones estándar de alojamiento, y que el AE tuvo un efecto favorable sobre este proceso en las ratas castradas.

997. (7582) ADENOSINA Y DIAGNÓSTICO TEMPRANO DEL TRASTORNO BIPOLAR. VEGGETTI, MARIELA; DE LORENZO, SILVANA; LOSAVIO, ADRIANA; MUCHNIK, SALOMÓN

Laboratorio de Neurofisiología. IDIM, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA.

Los criterios diagnósticos del Trastorno Bipolar están basados en aspectos clínicos siendo generalmente subdiagnosticado a expensas de la esquizofrenia. Los síntomas estarían causados por la hiperactividad de circuitos neurales asociados con un aumento de la secreción del neurotransmisor (NT). Junto a él se libera ATP cuya función per se o mediante su metabolito adenosina (AD), es modular la secreción del NT. Objetivo: investigar la existencia de alguna sustancia sérica presente en pacientes bipolares (PB) que modifique la neurosecreción en sinapsis neuromuscular. Inyectamos suero de sujetos sanos (SS), PB y esquizofrénicos (PE) a ratones registrándose frecuencia de potenciales de placa miniatura (fMEEP) en hemidiafragmas. Resultados: los ratones inyectados con suero de PB descompensados (PBD) disminuyeron la fMEEP/seg a 0.65 ± 0.03 , $n=17$ comparado con los sueros de SS (1.06 ± 0.03 , $n=9$), PB compensados (PBC, 1.11 ± 0.03 , $n=16$) o PE (0.98 ± 0.02 , $n=12$). En sinapsis neuromuscular AD induce inhibición presináptica de la secreción de ACh, por lo que incubamos estas preparaciones con CCPA, agonista de los receptores A1. En los ratones inyectados con suero de SS y PE, CCPA disminuyó la fMEEP, pero no en PBC y PBD. Para identificar la sustancia presente en el suero de PB, este fue filtrado (cut-off 3000) y las fracciones obtenidas fueron transferidas a ratones. La fMEEP obtenida con la inyección de la fracción de alto PM (FAPM) no se diferenció de la observada con el suero control, mientras que la fracción de bajo PM (FBPM) se comportó como el suero entero de dichos pacientes. Para evaluar si AD estaba involucrada en los resultados observados FBPM fue tratada con Adenosina deaminasa (ADA), que inactiva a la AD. Este procedimiento abolió el efecto observado con FBPM sin ADA. La modulación observada con el suero de PB se debería al incremento de la concentración de AD, como consecuencia de una hiperactividad neuronal. Este efecto no se observa con el suero de PE por lo que este estudio sería útil para establecer un diagnóstico temprano entre ambas entidades.

998. (7626) EL APRENDIZAJE DE UNA MEMORIA AVERSIVA INDUCE CAMBIOS EN LOS NIVELES PROTEICOS HIPOCAMPALES DE CAMKII, HOMER 1A, SINTAXINA 1A, C-FOS Y ERK2. MULLER IGAZ, LIONEL (1); BEKINSCHTEIN, PEDRO (1); IZQUIERDO, IVÁN (2); MEDINA, JORGE H. (1)

(1) Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, UBA; (2) Centro de Memoria, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Está ampliamente aceptado que la formación de la memoria de largo término (MLT) requiere de expresión génica neuronal y síntesis proteica de novo, mientras que la de corto término (MCT) es independiente de la síntesis de mRNA y proteínas. Hemos detallado al menos dos períodos durante los que la administración de inhibidores de la transcripción tiene un efecto amnésico: uno alrededor del momento del entrenamiento y otro 3 a 6 horas luego de él. Utilizando cDNA arrays, se pudieron identificar genes que posiblemente estén involucrados en la consolidación de la memoria para la tarea de evitación inhibitoria (EI). El análisis del RNA hipocampal extraído de ratas entrenadas o shockeadas, sacrificadas 3 ó 24 horas después del tratamiento, revela la modulación de genes involucrados en una variedad de procesos celulares. Para confirmar y profundizar estos hallazgos previos, decidimos estudiar mediante otras técnicas la regulación de estos genes candidatos. Utilizando RT-PCR, analizamos los niveles de mRNA correspondientes a syntaxin 1A, syndecan 3, Akt/PKB, IGF2, TrkB y el receptor de dopamina D1A. Los primeros cuatro mensajeros están aumentados 3 hs luego del entrenamiento y el de TrkB a las 24 hs ($p < 0.05$), mientras que no pudimos confirmar los cambios en el mRNA de D1A. También analizamos los niveles de ciertas proteínas en extractos hipocámpales a los mismos tiempos post-entrenamiento, y encontramos un aumento a las 24 hs de las siguientes proteínas: Homer-1a, syntaxin 1A, CaMKII alfa, ERK2 y c-fos ($p < 0.05$). Curiosamente, los nive-

les de ninguno de estos productos proteicos se encontró alterado 3 hs luego del entrenamiento, momento en que casi todos los respectivos mRNA sí lo estaban. Los resultados presentados indican que los paradigmas de un solo ensayo (como el utilizado aquí) permiten revelar una diversidad de productos génicos modulados por este entrenamiento, permitiendo un mayor conocimiento de las bases moleculares de la memoria.

999. (7695) POSIBLE CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CDK5 EN SEPTUM LATERAL Y EL AUMENTO EN LA ANSIEDAD POR EXPOSICIÓN AL ESTRÉS. BIGNANTE, EA(1); PAOLOROSI, M(1); RODRIGUEZ MANZANARES, PA(1); BUSSOLINO, DF(1); PAGLINI, MG(2); MOLINA, VA(1)

(1) *Dep. de Farmacología, Fac.Cs. Químicas,UNC.* (2) *Instituto de Investigaciones Médicas «Ferreyra»*

Es conocido que el estrés genera un proceso de sensibilización emocional. Este se refiere a la expresión de una respuesta emocional exagerada frente a un estímulo aversivo novel. Se ha demostrado la inducción de Cdk5 en septum e hipocampo por exposición a un evento aversivo. El objetivo de este trabajo fue determinar si esta proteína Cdk5 y/o su proteína activadora p35, en distintas áreas de cerebro estarían implicadas en las secuelas emocionales provocadas por inmovilización. Se utilizaron ratas machos Wistar (290-320 grs), ratones adultos carentes de la proteína p35 (p35^{-/-}) y ratones Wild Type (p35^{+/+}) con un background genético derivado de 129/Sv y C57BL/6J. Las ratas fueron inmovilizadas por una hora y sacrificadas inmediatamente para la determinación de los niveles de Cdk5 y p35 en áreas pertenecientes al circuito aversivo. Otro grupo fue evaluado comportamentalmente en el laberinto en cruz elevado (LEC) 24 hs después de finalizado el estrés en el caso de las ratas y 30 min después para los ratones. Adicionalmente, a un grupo de ratas se les implantó una cánula en septum lateral para la administración de olomoucina (inhibidor de la Cdk5), 15 minutos antes de la exposición a la inmovilización. La inmovilización aumentó los niveles de Cdk5 y p35 en septum, amígdala e hipocampo (por inmunohistoquímica y Western Blot), además disminuyó el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del LEC y esta disminución fue revertida por Olomoucina, pero no con el análogo inactivo Isolomoucina, en septum lateral. Los ratones p35^{+/+} pero no los p35^{-/-} inmovilizados exhibieron un porcentaje menor de permanencia en los brazos abiertos del LEC. El estrés aumenta la expresión de las proteínas Cdk5 y p35, en áreas como amígdala, septum e hipocampo, las cuales están relacionadas con el procesamiento de información emocional. Se sugiere que dicho aumento estaría relacionado con el proceso de sensibilización emocional inducido por estrés.

1000. (7832) LA INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA ACTIVA AL PROMOTOR DE MBP EN LA LÍNEA OLIGODENDROGLIAL N20 POR ESTABILIZACIÓN DE SP1 Y P27. CALATAYUD, CECILIA; GARCIA, CORINA; PAEZ, PABLO; SOTO, EDUARDO; PASQUINI, JUANA; PASQUINI, LAURA

Depto de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica; UBA, CONICET; Buenos Aires.

La participación del sistema Ub-proteasoma (SUbP) en la diferenciación neuronal ha sido comprobada por diversos autores. Nuestro laboratorio ha demostrado que la disminución de la actividad del proteasoma en cultivos primarios de oligodendrocitos (OLGc) produce aumento en su viabilidad, retiro del ciclo celular y su diferenciación precoz (Pasquini y col., 2003). Uno de los principales componentes estructurales de la mielina son las proteínas básicas (MBPs). La regulación del gen mbp se da a distintos niveles, siendo el principal el inicio de la transcripción. El promotor de MBP contiene numerosos sitios de unión a diversos factores de transcripción, entre ellos el receptor-T3, NF1, Sp1 y STATs. Para dilucidar el mecanismo por el cual la disminución en la actividad del proteasoma lleva a una diferenciación precoz de los OLGc utilizamos la línea oligodendroglial N20 transfectada

transientemente con el promotor de MBP unido a un gen reportero. Miskimis y col. (2002) han demostrado que la sobreexpresión de p27 en la línea celular CG4 incrementa la expresión del promotor de MBP aparentemente por inhibición de la degradación de Sp1. Tanto p27 como y Sp1 son degradados a través del SUBP. En nuestro sistema la disminución en la actividad del proteasoma lleva a la activación significativa del promotor de MBP, y al aumento en los niveles de p27 y Sp1. Santiago-Josefat y col (2003) han demostrado que a inhibición del proteasoma MG132 aumenta la fosforilación de Sp1 y su actividad transcripcional por estimulación de PKC. Así, la activación del promotor de MBP observada puede deberse al aumento en la actividad transcripcional de Sp1 por incremento de su estabilización y fosforilación. Estas hipótesis son confirmadas por los resultados obtenidos con los inhibidores mitramicina (de la unión de Sp1 al DNA) y esfingosina (de PKC), cuya inhibición sobre del promotor de MBP es restaurada en presencia de los inhibidores del proteasoma.

1001. (7838) EXPRESIÓN DE PLEIOTROFINA POR INTERNEURONAS ESTRIATALES. TARAVINI, IRENE¹; FERRARIO, JUAN¹; LARRAMENDY, CELIA¹; RICATTI, JIMENA¹; DELBE, JEAN²; COURTY, JOSE²; MURER, GUSTAVO³; RAISMAN, RITA²; GERSHANI, OSCAR¹

(1) *Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA), UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina;* (2) *INSERM U289 París, Francia;* (3) *Facultad de Medicina, UBA, Argentina.*

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por el daño parcial y selectivo de la proyección dopaminérgica nigroestriatal. Es un hecho conocido que las neuronas remanentes sufren cambios plásticos espontáneos e inducidos por el tratamiento con L-dopa. Recientemente encontramos aumentada la expresión de pleiotrofina (PTN) en el núcleo estriado de ratas con lesión nigroestriatal tratadas con L-dopa. Estudios recientes muestran que PTN estimula la diferenciación de neuronas mesencefálicas dopaminérgicas in vitro. El objetivo del presente trabajo fue identificar qué tipo celular expresa PTN en el estriado y la substantia nigra (SN). Mediante doble-inmunoconjugación fluorescente encontramos que PTN colocaliza con NeuN (marcador neuronal) pero no con GFAP (marcador glial) tanto en el estriado como la SN. En la SN PTN colocalizó con TH (marcador de neuronas dopaminérgicas). En el estriado, la distribución, abundancia y morfología de neuronas marcadas sugirió que PTN es expresada por interneuronas. Por doble inmunomarcación determinamos que PTN no es expresada por las interneuronas calretinina positivas y parvalbúmina positivas. En cambio, PTN está presente en ~42% de las interneuronas que expresan óxido nítrico sintetasa y somatostatina (rango 33-52%, n=3) y en ~61% de las interneuronas que expresan el transportador vesicular de acetilcolina (rango 60-62%, n=3). También estudiamos la distribución de N-syndecan, receptor para PTN, y encontramos que colocaliza con TH en la SN. Estos resultados sugieren que PTN in vivo es liberada por interneuronas estriatales y por las propias neuronas dopaminérgicas, la cual podría mediar fenómenos plásticos en las neuronas nigroestriatales remanentes en el parkinsonismo.

1002. (7866) EFECTO DE LA GAP-43 EN LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS NIH3T3 TRANSFECTADAS EN FORMA ESTABLE. DE MOLINER, KARINA(1); WOLFSON, MANUEL(1); PERRONE-BIZZOZERO, NORA(2); ADAMO, ANA(1)

(1) *Depto. Quím. Biol.,UBA.IQUIFIB-CONICET;* (2) *Dept. Neurosciences, University of New Mexico HSC, Albuquerque, NM, USA.*

La GAP-43 es una fosfoproteína específica de las neuronas, que se encuentra especialmente en el cono de crecimiento neuronal y en las sinapsis. Recientemente, Huang et al. demostraron que líneas celulares provenientes de gliomas pierden la expresión de la GAP-43 y que su re-expresión en células C6 de-

ficientes resultó en la supresión del crecimiento. En el presente trabajo, estudiamos la influencia de la sobre-expresión estable de GAP-43 en la progresión del ciclo celular de células NIH3T3. Primeramente, evaluamos el efecto de la GAP-43 en la adhesión celular. Los clones seleccionados se fijaron a distintos tiempos después del plaqueo y las células adherentes fueron cuantificadas utilizando la tinción con violeta cristal. Las células que expresan GAP-43 mostraron cambios morfológicos compatibles con la función de esta proteína, incluyendo la aparición de procesos, pero no se observaron cambios en la adhesión celular con respecto a las células controles. Para investigar el posible efecto de la expresión de GAP-43 en la progresión del ciclo celular, las células fueron sincronizadas por privación de suero y los núcleos, sometidos a tinción con yoduro de propidio, fueron analizados por citometría de flujo a distintos tiempos de cultivo en presencia de medio completo. Los resultados muestran que un 47.5% de las células que expresan GAP-43 se arrestan en la fase G0/G1 después de 18 hs en cultivo, mientras que sólo un 23.2% de las células controles permanecen en la fase G0/G1. Estos resultados están de acuerdo con la disminución en la proliferación celular que observamos en las células que expresan GAP-43 después de 72 hs de cultivo. Posteriormente analizamos los niveles de ciclina D1 y Cdk4 y observamos una disminución en las células que expresan esta proteína. Aunque la GAP-43 se expresa en neuronas post-mitóticas, nuestros resultados sugieren que esta proteína puede tener un papel en la regulación del ciclo celular en estadios tempranos de diferenciación neuronal.

1003. (7887) DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO EN MICRODOMINIOS LIPÍDICOS DE CÉLULAS CHO-K1/A5 Y CHO-K1/GM2.
BERMUDEZ, VICENTE; PICARDI, VICTORIA; BONINI, IDA; BARRANTES, FRANCISCO J

INIBIBB y Cátedra UNESCO de Biofísica y Neurobiología Molecular. Bahía Blanca.

Hemos estudiado la distribución del receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) en microdominios lipídicos («balsas» o «rafts»), y en particular la participación de gangliósidos en tales plataformas. Utilizamos para tal fin dos líneas celulares generadas en el laboratorio: CHO-K1/A5 y CHO-K1/GM2. La primera de éstas expresa heterológicamente el AChR de tipo muscular murino adulto y carece de la capacidad de sintetizar el gangliósido GM2 -por ende no puede producir GM1, postulado como lípido residente de microdominios. La segunda es una línea creada en nuestro laboratorio por transfección estable de la CHO-K1/A5 con la GM3:N-acetilgalactosaminil transferasa (GM2 sintasa), rescataando así la producción de GM2 y GM1. Se estudió la distribución del AChR en gradientes de sacarosa tras la solubilización de las dos líneas celulares en Triton X-100. El AChR proveniente de células CHO-K1/A5 se localizó exclusivamente en las fracciones de mayor densidad, mientras que en el caso de células CHO-K1/GM2 se observó su presencia también en fracciones más livianas. Se observaron, además, diferencias en el perfil lipídico de las fracciones subcelulares de ambos tipos celulares. El contenido de colesterol (col) es mayor en las fracciones medias, características de las balsas, en el caso de CHO-K1/GM2. La relación fosfolípido/Col fue mayor en las fracciones pesadas de los gradientes de CHO-K1/A5 y en las medias de CHO-K1/GM2. La incubación de las células CHO-K1/GM2 con toxina colérica, ligando de GM1, resultó en el desplazamiento del AChR a las fracciones livianas del gradiente. La localización diferente del AChR en los microdominios de los dos tipos celulares podría atribuirse a la presencia de gangliósidos.

1004. (8019) LAS CELULAS EPITELIALES DE RETINA ARPE-19 PROMUEVEN LA SUPERVIVENCIA DE LOS FOTORRECEPTORES Y LA REORGANIZACION ESPACIAL EN COCULTIVOS CON NEURONAS DE RETINA.
BUZZI, E. (1); GERMAN, O.L. (1); RODRÍGUEZ-BOULAN, E. (2); POLITI, L.E. (1)

(1) Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Bahía Blanca; (2) M. Dyson Vision Research Institute and Dept. of Cell Biology and Anatomy, Cornell University, NY.

El epitelio pigmentado de retina libera factores que protegen a las neuronas fotorreceptoras. La naturaleza de estas interacciones no ha sido completamente elucidada. Para estudiarlas, utilizamos cocultivos de células tumorales de epitelio pigmentado ARPE-19 con neuronas de retina de rata. Cultivos neuronales puros, sin factores tróficos, mostraron más de un 70% de fotorreceptores apoptóticos al día 8, mientras que en cocultivo, éstos disminuyeron hasta un 50%. Las ARPE-19 estimularon también la diferenciación de procesos apicales y la expresión de opsina en los fotorreceptores. Anteriormente demostramos que al entrar en contacto células neuronales y epitelio, se promueve una rápida reorganización espacial de las neuronas. Observamos ahora que las células ARPE-19 sembradas sobre las neuronas rápidamente extendieron lamelipodios por debajo de éstas, desprendiéndolas de su sustrato y ubicándose por debajo de las mismas, generando su desplazamiento ulterior hacia los bordes del epitelio. El epitelio promovió el crecimiento axonal: en los cocultivos aumentó 80% el porcentaje de fotorreceptores con axones, incrementándose su longitud. Las células epiteliales regularon también la orientación de dichos axones. En fotorreceptores localizados sobre el epitelio, los axones crecieron rudimentariamente; en los localizados a menos de 50 µm de distancia, los axones se orientaron paralelos a las células epiteliales, o claramente alejándose de ellas, y a más de 100 µm, los axones se orientaron al azar. Estos resultados muestran que las células ARPE-19 promueven la activa reorganización espacial de las neuronas de retina, estimulan la diferenciación de los fotorreceptores y liberan factores que promueven el crecimiento y la orientación de sus axones.

1005. (8029) SEÑALES QUE PARTICIPAN EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL ETANOL Y EN LA PROTECCIÓN POR GDNF EN UN BIOENSAYO DE CÉLULAS GLIALES.
VILLEGAS, NAHUEL (1,2); FRANCISCO, ELINA (1); GOMEZ, MARTIN (1); REYNALDO, MIRTA (1); LINDEN, RAFAEL (2); CARRI, NÉSTOR GABRIEL (1)

(1) CIC-IMBICE, La Plata; (2) Laboratorio de Neurogénesis, UFRJ, Brasil

Datos previos de nuestro laboratorio demuestran que el etanol induce muerte celular por apoptosis en células de la línea glial B92, y el tratamiento con GDNF (glial-derived neurotrophic factor) previene significativamente dicha inducción sugiriendo que la/s señal/es transducida/s por este factor estaría/n interfiriendo con la/s disparada/s por el etanol. El presente trabajo investiga posibles señales involucradas en la toxicidad etanólica y en la protección por GDNF. Se trataron los cultivos con 86 y 172 mM EtOH durante 60 y 120 min., solos o en combinación con 30 ng/ml GDNF y/o en combinación con los inhibidores específicos de señales: SP600125 para la vía JNK, LY29002 para AKT y UO126 para MEK 1/2. Los marcadores de fenotipo glial usados fueron GFAP y vimentina. Los núcleos apoptóticos fueron identificados tras ser teñidos con DAPI o Höesch. Como resultado se obtuvo que: el bloqueo de la vía de transducción JNK, redujo significativamente la inducción de apoptosis por el etanol ($P < 0.05$); la inhibición de las vías AKT y MEK 1/2 individualmente no interfiere con el efecto protector del GDNF ($P < 0.05$); la inhibición simultánea de estas dos cascadas bloquea la protección por GDNF ($P < 0.001$). Estos datos permiten sugerir que el etanol induce apoptosis en células gliales B92 a través de la señal transducida por JNK. El efecto protector brindado por el GDNF podría ser mediado por las vías de sobrevida AKT y MEK 1/2. El bloqueo de una sola de estas dos vías no es suficiente para revertir el efecto protector del GDNF, evidenciando un posible mecanismo de compensación de funciones.

1006. (8037) EFECTO DE TRATAMIENTOS CRÓNICOS DE MORFINA EN NEURONAS SENSORIALES: AUMENTO

DE INMUNOREACTIVIDAD DEL RECEPTOR OPIOIDE DELTA. DANIELE, MARÍA LAURA; LÓPEZ, HÉCTOR

Instituto «Mercedes y Martín Ferreyra»

Los receptores opioides median las respuestas analgésicas de sustancias como la morfina. Existen tres subtipos de receptores opioides: μ (ROM), δ (ROD) y κ (ROK), que al ser activados por su ligando específico producen diferentes respuestas celulares según el órgano blanco. En neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal (GRD) la activación de ROM (principal mediador de los efectos provocados por los opiáceos) y los ROD modula la transmisión sináptica del dolor. Cahill y colaboradores (2001) demostraron que aplicaciones crónicas de morfina (efecto mediado por ROM) aumentan el número de ROD en membranas neuronales tanto in vivo (células medulares) como in vitro (células corticales); posibilitando el uso de cantidades pequeñas de agonistas ROD como analgésicos en experimentos conductuales. Dada la relevancia de este hallazgo, planteamos como objetivo en este trabajo: observar el efecto de la aplicación de morfina en la distribución de los ROD en neuronas del GRD. En los tratamientos in vivo se administraron dosis crecientes de morfina: 5, 8, 10 y 15 mg/kg de peso cada 12hr durante 2 días a 6 ratas (PN 7-9, cepa Wistar) con número igual de controles. Luego se perfundieron y con técnicas inmunohistoquímicas se detectó ROD. En tratamientos in vitro se agregó morfina 10 μ M a 3 cultivos neuronales durante 48 hr. A través de inmunocitoquímica se evidenció ROD. Conteos de células marcadas sobre células totales (ganglio y cultivo) se realizaron con microscopio confocal. Los resultados se analizaron aplicando ANOVA. Las inyecciones de morfina elevaron el número de células inmutables de un 10,3 \pm 2,5% (control) a 24 \pm 1,7%, esta diferencia fue significativa (F 22,219/p<0.001). In vitro, las diferencias también fueron significativas (F 32,197/p<0.029), 28,8 \pm 0,4% (control) a un 38,5 \pm 2,4% (morfina) Tanto in vivo como in vitro las aplicaciones de morfina (activa ROM) produjeron un aumento de neuronas ROD inmunopositivas, queda por evaluar la importancia fisiológica de este fenómeno.

1007. (8070) INCIDENCIA DE RECAÍDAS EN PACIENTES ESQUIZOFRÉNICOS LUEGO DEL REEMPLAZO DE NEUROLÉPTICOS CONVENCIONALES POR ANTIPSI-CÓTICOS ATÍPICOS. ZELASCHI, NORBERTO MARIO; RODRÍGUEZ, JUANA; PALACIOS VALLEJOS, EUGENIA; KUCZYNSKI, MIGUEL; GAITÁN, SERGIO; ZIEHER, LUIS MARÍA

Hospital Dr. «A. Korn». Facultad de Medicina UNLP; Facultad de Medicina UBA. CONICET

Introducción: Los antipsicóticos atípicos (APA) bloquean receptores DA-5ht A2 mejorando los síntomas psicóticos resistentes y la calidad de vida con menor incidencia de efectos adversos. Este estudio presenta evidencia sobre los efectos de los APA en el tratamiento de la esquizofrenia en pacientes hospitalizados resistentes. Método: Se usó un diseño abierto naturalístico y se evaluó la incidencia total de recaídas. Se compararon los grupos según el tratamiento, número de casos (n) y dosis diaria en mg (d/d); los valores se expresaron en promedio \pm 1 DS: 1) clozapina (cloz) x edad = 44.10 (10.30), n = 12, d/d = 202-600. 2) risperidona (ris) x edad = 55.72 (11.36), n = 13, d/d = 2-6. 3) olanzapina (olan) x edad = 48.71 (9.05), n = 14, d/d 20-60. 4) ziprasidona (zip) x edad = 46.07 (10.97), n = 13, d/d = 40-60. Se empleó la escala CGI (Clinical Global Impression) para seguir la evolución y determinar las recaídas psicóticas. Todos los casos incluidos se ajustaron a los criterios de resistencia al tratamiento; las evaluaciones se realizaron mensualmente y el seguimiento mínimo fue de 6 meses. Se requirió un consentimiento informado verbal no escrito; las drogas fueron suministradas por la farmacia del hospital. Resultados: No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las edades (F = 2.62, p = .06). Recaídas: Cloz = 0 (0: 12); ris = 9 (9: 13); olan 9 (9: 14); zip = 11 (11: 13). El test de X² mostró una diferencia estadísticamente muy significativa

entre los cuatro tratamientos (x² = 52.47, p = .0000). Estos resultados confirmaron hallazgos previos ya presentados sobre la aparente superioridad antipsicótica de la clozapina en pacientes psicóticos resistentes. A pesar de las limitaciones de este estudio abierto, podríamos sugerir que dado el adecuado período de seguimiento, estos resultados podrían validar la presunción de que existen diferencias sustanciales entre los diferentes APA.

1008. (8098) PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES NMDA EN LA EXTINCIÓN DE LA MEMORIA EN EL CANGREJO CHASMAGNATHUS. PÉREZ-CUESTA, LUIS MARÍA; MALDONADO, HÉCTOR

Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, DFBMC, FCEN, UBA

La extinción de la memoria es un proceso por el cual una respuesta condicionada decae en su frecuencia o intensidad por la presentación repetida del estímulo condicionado (EC) sin el refuerzo, o estímulo incondicionado (EI). En este trabajo, mediante inyecciones de MK-801, investigamos la participación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA en este proceso mnésico en el cangrejo Chasmagnathus. Para esto utilizamos el paradigma de memoria contexto-señal, en el que los animales asocian un estímulo visual de peligro (EI) con el contexto (EC) en que éste les es presentado. La consolidación y la reconsolidación de esta memoria, pero no su adquisición, están mediadas por receptores NMDA. En este trabajo encontramos que, por el contrario, la memoria de extinción depende de receptores NMDA para su adquisición, pero no para su consolidación. Analizamos además la relación existente entre los procesos de extinción y reconsolidación de esta memoria, respecto de la actividad de estos receptores. En este modelo, la presentación del EC dispara el proceso de extinción o el de reconsolidación de esta memoria dependiendo solamente de su duración. Por esto, el curso temporal de actividad de estos receptores tras la exposición al EC cobra particular importancia.

NEUROCIENCIAS 12: CELULAR Y MOLECULAR 9 / CRONOBIOLOGÍA 2

1009. (6877) ANÁLISIS DINÁMICO NO LINEAL DE LA REGULACIÓN AUTONÓMICA DEL RITMO SINUSAL EN PACIENTES CON TRASTORNOS ALIMENTARIOS. VIGO, DANIEL E.; GUINJOAN, SALVADOR; DÖRPINGHAUS, M. ANDREA; ROVIRA, BERNARDO; CHANDLER, EDUARDO; NICOLA SIRI, LEONARDO; BERBARA, CARLOS; ORTIZ FRÁGOLA, ALFREDO; CARDINALI, DANIEL P.

Lab. de Neurociencias, Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA Depto. de Salud Mental, Htal. de Clínicas, UBA; Facultad de Bioingeniería, UNER.

Antecedentes: Los pacientes con anorexia nerviosa (AN) y bulimia nerviosa (BN) presentan anomalías nutricionales e hidroelectrolíticas perjudiciales para el funcionamiento cardíaco. Sin embargo las complicaciones como muerte súbita son relativamente raras en este grupo de pacientes. El análisis lineal de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca (VFC) reveló que los pacientes con anorexia nerviosa presentan un retiro del componente simpático de la VFC. No se han realizado estudios con métodos no lineales que cuantifiquen correlación fractal (CoFr) o entropía (ApEn). Objetivo: Analizar si los componentes no lineales de la VFC se encuentran alterados en este grupo de pacientes. Material y Método: Se estudiaron 15 pacientes con AN, 17 con BN y 17 controles normales. Se registró la duración del intervalo RR a lo largo de 10 minutos, cuantificando indicadores lineales y no lineales de VFC. Se compararon diferencias utilizando ANOVA de un tratamiento. Resultados: CoFr (media \pm DS): normales: 1.19 \pm 0.26; anorexia: 0.91 \pm 0.27; bulimia: 1.09 \pm 0.22. normales vs AN: p = 0.006; normales vs BN: p = 0.500; AN vs

BN $p = 0.089$. ApEn (media \pm DS): normales: 1.12 ± 0.09 ; anorexia: 1.07 ± 0.12 ; bulimia: 1.09 ± 0.09 . normales vs AN: $p = 0.382$; normales vs BN: $p = 0.676$; AN vs BN $p = 0.851$. Conclusiones: Los pacientes con AN presentan una variabilidad de la frecuencia cardíaca con correlación fractal disminuida, sin cambios significativos en el grado de entropía. Es posible que ello refleje la pérdida del control simpático sobre la regulación autonómica del ritmo sinusal, o bien la pérdida de un componente regulatorio simpático más ordenado que el remanente parasimpático.

1010. (6908) NGF Y LUZ CORREN HACIA EL RELOJ CIRCADIANO POR EL CARRIL DE ERK Y FOS. PIZZIO, GASTÓN ALFREDO; HAINICH, E. C.; PLANO, S.A.; GOLOMBEK, D.A.

Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires.

EL reloj molecular que dirige los ritmos circadianos en mamíferos se encuentra en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo. La luz es capaz de poner en hora al reloj activando diferentes vías de señalización que activan genes y finalmente modifican su oscilación circadiana. La vía clásica activada por la luz implica la entrada de Ca^{2+} a las células de los NSQ producto de la activación de los canales NMDA por glutamato. Existen vías complementarias poco estudiadas. En este trabajo analizamos una de ellas en la cual participa el Factor de Crecimiento Neural (NGF). NGF muestra un efecto similar al producido por estímulos fóticos, tanto en patrones comportamentales como moleculares. Se utilizaron hámsteres a los cuales se les aplicó NGF (20 ng) en forma i.c.v. y se analizaron sus efectos sobre la actividad locomotora en rueda, activación transcripcional de FOS por inmunohistoquímica y activación posttranscripcional de ERK-MAPK (External Regulated Kinase – Mitogen Activated Protein Kinase) por western blot. La Curva de Respuesta de Fase a NGF es de tipo fótica: sin efectos durante el día subjetivo (horas circadianas, CT, 6 y 24), retrasos de fase en el inicio de la noche subjetiva (CT 13,5: $-36 \pm 4,7$ min) y adelantos de fase hacia el final de la noche subjetiva (CT 18: $+56 \pm 10$ min). Los efectos de NGF y luz no son aditivos a CT 13.5 (NGF -40 ± 8 min, LUZ -66 ± 13 min, NGF+ LUZ $-60 \pm 6,9$ min) sugiriendo un paso en común en su mecanismo de acción. NGF es capaz de activar FOS en los NSQ en la noche subjetiva a CT 18 y no a CT6, de la misma manera que los pulsos de luz. En un punto intermedio de estas vías demostramos que NGF a CT 18 activa la vía de ERK1/2-MAPK ($p < 0,031$ test de Student a 1 cola) sin tener efecto a CT 6. Estos resultados concuerdan lo obtenido anteriormente (Pizzio et. al., 2003) con pulso de luz. Con este trabajo implicamos funcionalmente a NGF en el sistema circadiano. Dado que NGF comparte el efecto de la luz, podría ser un factor que module la sincronización fótica del reloj biológico.

1011. (7041) ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES EN LA DEGENERACIÓN RETINIANA INDUCIDA POR LA LUZ: DIFERENCIAS CON ANIMALES ADRENOPRIVOS. LOPEZ, ESTER MARIA; JULIAN, LILIANA KARINA; COIRINI, HECTOR; LOPEZ-COSTA, JUAN JOSE

Instituto de Biología Celular y Neurociencias «Prof. Dr. Eduardo De Robertis». IBCyN «Prof. E. De Robertis»; Servicio de Oftalmología, Hospital de Clínicas, UBA; IBYME

En trabajos previos, utilizando la técnica de hematoxilina-eosina y microscopía óptica para medir el espesor de la retina, hemos demostrado que la ablación de las glándulas suprarrenales previene parcialmente el daño inducido por iluminación continua (IC). El objetivo del presente trabajo ha sido realizar un estudio ultraestructural durante la degeneración de la retina inducida por IC y caracterizar el tipo de muerte neuronal que ocurre en este tejido, evaluando el grado de estos cambios en ratas controles (CTL) y adrenalectomizadas (ADX). Ratas de ambos grupos experimentales fueron sometidas a IC durante 7 días (12.000 lux). Los animales fueron sacrificados a $t=0$ (antes de

iniciar la IC) y a $t=1, 2, 5$ y 7 días de IC. Los ojos fueron fijados por inmersión en buffer fosfato 0,1 M conteniendo paraformaldehído 4%, glutaraldehído 0,25% y los bloques de tejido fueron deshidratados e incluidos en Durcupán. Cortes ultrafinos fueron teñidos con citrato de plomo y observados con un microscopio electrónico Zeiss 110. A las 24 hs de IC, se verificó la presencia de alteraciones de los segmentos externos e internos de los fotorreceptores. La degeneración retiniana progresó a lo largo de los días 2 y 5, siendo máxima a los 7 días de IC, cuando se observaron restos celulares en la interfase con el epitelio pigmentario, el cual estaba edematizado. Se observaron además núcleos picnóticos y fragmentación nuclear en la capa nuclear externa en CTL y ADX. No se observó la presencia de infiltrado inflamatorio en el tejido. Se encontraron modificaciones mitocondriales importantes en neuronas de las capas plexiforme externa y nuclear interna. Estos resultados señalan que la degeneración de la retina durante IC ocurre como consecuencia de una muerte celular programada o apoptosis. Dado que los cambios son más marcados en los animales CTL respecto de los ADX, estas evidencias apoyan la idea que la hormonas adrenales favorecen la muerte apoptótica en la retina sometida a IC. (UBACYT-M020).

1012. (7302) EXPOSICIÓN CRÓNICA AL ETANOL EN DISTINTAS EDADES: DIFERENTES PERFILES DE RECUPERACIÓN DEL HIPOCAMPO TRAS UNA LARGA ABSTINENCIA. EVRARD, SG; DUHALDE VEGA, M; MIROCHNIC, S; TAGLIAFERRO, P; RAMOS, AJ; BRUSCO, A

Instituto de Biología Celular y Neurociencias «Prof. E. De Robertis», Facultad de Medicina, UBA

El etanol (EtOH) altera las relaciones neuro-gliales (RNG) en el feto y en el adulto. En este trabajo comparamos morfológicamente las alteraciones de las RNG en el hipocampo de crías y adultos y su capacidad de recuperación espontánea (RE) mucho después de la exposición al EtOH. Se expuso un grupo de ratas Wistar macho adultas al EtOH 6,6% v/v en el agua de bebida por 6 semanas; luego se las pasó a un período de recuperación de 10 semanas bebiendo agua (c/RE). A un grupo de ratas hembra adultas se lo expuso al EtOH 6,6% por 6 semanas y durante la gestación; un subgrupo de madres, en los días G13-G20, recibió una dosis diaria (4 mg/kg sc) de buspirona (un agonista parcial 5-HT_{1A}) o un volumen equivalente de solución salina; el EtOH se retiró en PN0; en ambos subgrupos, las crías fueron evaluadas en PN5 (consideradas sin RE -s/RE-) y en PN60 (c/RE y con RE + buspirona -RE+B-). Los cortes de cerebro se procesaron por inmunocitoquímica con anticuerpos primarios para GFAP, S-100B y MAP-2. Se evaluó el área CA1 del hipocampo por análisis digital de imágenes. Tanto en las crías como en los adultos expuestos al EtOH s/RE, se observó hipertrofia astrogliar; la inmunoreactividad (IR) a la S-100B aumentó en los astrocitos de las crías s/RE y disminuyó en los adultos s/RE; el área relativa de las fibras MAP-2-IR disminuyó en ambos grupos etarios. En los animales del grupo c/RE, el área celular astrogliar y la S-100B-IR persistieron altas en las crías pero tendieron a valores control en los adultos; el área relativa de las fibras MAP-2+ permaneció baja en las crías y tendió a recuperarse en los adultos. En las crías del subgrupo RE+B, el área celular astrogliar, la S-100B-IR y la MAP-2-IR retornaron a niveles controles. Tras la abstinencia, los adultos parecen mostrar mayor capacidad de RE que las crías gestadas en presencia de EtOH, en tanto que las crías que adicionalmente recibieron buspirona (RE+B) recuperaron la morfología normal. Realizado con subsidio UBACYT M-072.

1013. (7526) VIAJE INMUNE: DESDE LOS ASTROS AL RELOJ LEONE, MARIA JULIANA (1); MARPEGAN, LUCIANO (1); BEKINSCHTEIN, TRISTAN (1); COSTAS, MONICA (2); GOLOMBEK, DIEGO (1)

Laboratorio de Cronobiología, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Bs As, Argentina (2) Instituto de Investigaciones Médicas «Dr. Alfredo Lanari». Buenos Aires, Argentina

El sistema circadiano de mamíferos, cuyo oscilador central se localiza en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), modula variables inmunológicas que muestran ritmos diarios y circadianos. Nosotros postulamos la existencia de una vía de retroalimentación desde el sistema inmune a los NSQ. La inyección de Lipopolisacárido bacteriano (LPS, 25 ug/kg) induce una Curva de Respuesta de Fase (PRC) de tipo fótica. Los retrasos de fase producidos por LPS a CT 15 (-43±10 minutos) no mostraron efectos aditivos al ser coadministrados con pulsos de luz. Retrasos similares fueron obtenidos con la administración intracerebroventricular de IL-1alfa (30 ng/kg) y TNFalfa (100 ng/kg) a CT15. Asimismo, sulfasalazina (120 mg/kg) -un inhibidor específico de NF-kB- bloquea los retrasos de fase inducidos por LPS (-15±13min). Los NSQ se encuentran altamente enriquecidos en células astrogiales y muestran una alta inmunoreactividad de glial fibrillary acidic protein (GFAP-Ir), marcador específico de astrocitos. Las señales inmunes podrían tener como blanco a células astrogiales, capaces de expresar y responder a citoquinas. Por este motivo analizamos su rol como mediadores de dichas señales al oscilador central. GFAP y NF-kB colocalizan en cortes y en cultivos primarios gliales de NSQ. La GFAP-Ir muestra una tendencia a presentar variaciones con valores máximos a ZT3 y mínimos a ZT 21. La capacidad de responder a estímulos inmunes fue evaluada por transfección de los cultivos con un vector conteniendo el gen de luciferasa bajo el control de un promotor activable por NF-kB. La actividad kB aumentó en respuesta a LPS 2 ug/ml, TNFalfa 20 ng/ml e IL-1alfa 100 ng/ml. En conjunto, los resultados aquí presentados sugieren que variables inmunológicas pueden regular al oscilador central y que esta interacción está mediada, al menos parcialmente, por la glía. Producido por: ANPCyT - Antorchas - UNQ - CONICET

1014. (7580) BALANCE ENTRE AMINOÁCIDOS EXCITATORIOS E INHIBITORIOS HIPOTALÁMICOS Y SU RELACIÓN CON LA LH PLASMÁTICA LUEGO DE LA INYECCIÓN DE INTERFERÓN GAMMA. BOGGIO, VERONICA; REYNOSO, ROXANA; SZWARCFARB, BERTA; SCACCHI, PABLO; CARDINALI, DANIEL; CUTRERA, RODOLFO

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

Se sabe que la liberación de LH se encuentra controlada por varios factores, entre ellos, los aminoácidos hipotalámicos que actúan regulando la secreción de Gn-RH. En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración de interferón gamma (IFNg) sobre la secreción de LH y el contenido hipotalámico de ácido glutámico (Glu), aspártico (Asp) y GABA, en relación con el ciclo luz oscuridad. Se administró IFNg (40 UI/ml, i.c.v.) o vehículo a hámsteres dorados, machos adultos (alojados 14:10 L:O, ZT12 hora de apagado de luces), sacrificándose los animales 1 hora después. Se determinó LH sérica (RIA, ng/ml) y se disecó el área preóptica/hipotálamo medio basal para la medición del contenido de aminoácidos (HPLC, nmol/mg de prot). La administración de IFNg a ZT6 redujo significativamente el contenido de los aminoácidos excitatorios (Glu: 23.28%, $p = 0.025$; Asp: 51%, $p = 0.014$) sin modificar el de GABA. A ZT18, IFNg redujo el contenido de Glu y GABA hasta el límite de detección del ensayo ($p < 0.001$) sin producir efecto sobre el Asp. En los niveles plasmáticos de LH, luego de la administración de IFNg a ZT 6, se observó una tendencia al aumento no significativa. A ZT18, se produjo un descenso en los niveles hormonales del 54% ($p = 0.006$). Los resultados indican, que la disminución en el contenido de Glu sin cambios en el de GABA, coexisten con un aumento en los niveles plasmáticos de LH durante la fase de luz. Sin embargo, la depleción de GABA y de Glu, llevarían a una disminución en estos niveles durante la fase oscuridad. Si bien, el aumento de la secreción de LH se asocia con una disminución en el contenido de Glu y/o a un aumento en el de GABA, nuestros resultados sugieren que el efecto inhibitorio del GABA prevalece sobre el excitatorio del Glu.

1015. (7598) ESTOCASTICIDAD Y DETERMINISMO CARACTERIZAN LA DINÁMICA DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS

NEUROEPITELIALES EN EL SNC EN DESARROLLO. RAPACIOLI, M (1); MAZZEO, J (3); FUENTES, F (2); DI GUILLMI, M (2); ORTALLI, A.L (2); D'ATELLIS, C (1); FLORES, V (1,2)

Grupo Interdisciplinario de Biología Teórica Universidad Favaloro. (2)Inst. Biología Celular y Neurociencias Fac Medicina UBA (3)Inst Ing Biomédica Fac Ingeniería UBA

La proliferación celular (PC) es un comportamiento celular con efectos morfogénéticos histogénéticos y funcionales. Clásicamente es analizada mediante el índice mitótico y otros derivados del mismo que no incorporan la dinámica del proceso. El presente trabajo apunta a diseñar un modelo de la dinámica temporal-espacial de la PC que contribuya a la comprensión de sus efectos de desarrollo y de sus mecanismos de control. Se analiza la PC como proceso estocástico puntual. La PC es registrada como (a) secuencias binarias [1 (mitosis) - 0 (interfase)] y (b) de intervalos inter-mitóticos en cortes histológicos del Tectum Optico del embrión de pollo coincidentes con el eje céfalo-caudal. Las señales de PC fueron comparadas con procesos estocásticos simulados, con parámetros conocidos, a los cuales se agregaron características de las señales de PC y con señales de PC subrogantes destendenciadas. Los tres tipos de señales fueron procesadas por medio de algoritmos que permiten (a) diferenciar procesos estocásticos homogéneos (no correlacionados y sin memoria) de otros que poseen correlaciones y fractalidad y (b) estimar el coeficiente de escala que caracteriza la dinámica del proceso. Los algoritmos utilizados fueron Factor de Fano (FF), Factor de Allan (AF) y Análisis de Fluctuaciones Destendenciadas (DFA). Los coeficientes de escala brindados por los tres algoritmos, aplicados a señales de PC, subrogantes de PC y simuladas, permiten concluir que la PC está espacialmente organizada y que su dinámica suma dos componentes: a) uno estocástico no-correlacionado que representa una actividad proliferativa basal uniforme a lo largo del eje céfalo-caudal y (b) un componente no-estacionario que imprime una tendencia global definida al proceso. La tendencia no estacionaria, que admite una descripción determinística, puede ser interpretada como la manifestación de un control organizante que opera a lo largo del eje céfalo-caudal del sistema.

1016. (7660) ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN SINÁPTICA AFECTAN DIFERENCIALMENTE OSCILADORES CIRCADIANOS EN DROSOPHILA. FERNÁNDEZ, MARÍA DE LA PAZ; CERIANI, MARÍA FERNANDA

Fundación Instituto Leloir

Los ritmos circadianos permiten a los organismos adaptarse a los cambios ambientales, otorgándoles una ventaja adaptativa. Las oscilaciones moleculares deben transmitirse para posibilitar la ritmicidad a nivel fisiológico y comportamental, y la regulación de la excitabilidad de la membrana es un mecanismo clave. En *Drosophila*, el silenciamiento eléctrico de las células del reloj provoca arritmicidad comportamental y altera las oscilaciones moleculares (Cell 2002,485). Dada la arritmicidad de un mutante nulo en el canal de potasio slowpoke, slo4, y el hecho de que tanto slo como su regulador oscilan (JNeurosci 2002,9305), buscamos determinar el rol del canal en el control rítmico del comportamiento. Se utilizaron líneas transgénicas con distintas versiones del canal y se pudo comprobar que la línea que expresa la versión neuronal rescata el fenotipo de slo4. Dicha arritmicidad podría deberse a una disfunción de distintos osciladores en el cerebro, los cuales fueron evaluados por inmunohistoquímica. Mediante curvas de tiempo se analizó la localización subcelular de los componentes del reloj y no se encontraron alteraciones en oscilaciones moleculares en las neuronas laterales ventrales (LNvs). En paralelo analizamos otros clusters de neuronas relevantes para el reloj, las neuronas dorsales (DN1, DN2 y DN3) hacia las cuales se ha postulado que se dirige la información de las LNvs, y encontramos que éstos están alterados en slo4. Si bien SLO no colocaliza con ninguno de los osciladores mencionados los defectos observados a nivel de las DN1 claramente lo

involucran en el circuito relevante para el control de la ritmicidad comportamental. Finalmente, encontramos aberraciones en el patrón de expresión de PDF, el neuropéptido secretado por las LNvs. Estos resultados muestran que la actividad eléctrica juega un rol fundamental en la propagación de las oscilaciones circadianas, y presentan nuevos circuitos neuronales involucrados en la transmisión de la información downstream de las LNvs.

1017a. (7901) SEGREGACIÓN LATERAL DE FOSFATIDILCOLINA Y ÁCIDO FOSFATÍDICO EN MEMBRANAS RECONSTITUIDAS DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO. WENZ, JORGE; BARRANTES, FRANCISCO J.

INIBIB y Cátedra UNESCO de Biofísica y Neurobiología Molecular. Bahía Blanca.

Con el objetivo de investigar la preferencia del receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) por diferentes fases lipídicas, extractos de la proteína purificada por cromatografía de afinidad fueron reconstituidos en dos sistemas lipídicos (DPPC/DOPC y POPA/POPC), en presencia o ausencia de colesterol (Chol) y de un lípido extintor de fluorescencia (7-SLPC). Vesículas con diferentes composiciones y proporciones lipídicas, conteniendo difenilhexatrieno (DPH) y pireno-fosfatidilcolina (PyPC) como fluoróforos, fueron analizadas mediante espectroscopia de fluorescencia en función de la temperatura. La disminución de la extinción de la fluorescencia del DPH y del AChR por el 7-SLPC (comportamiento de fase similar al de un lípido insaturado) indica que el AChR promueve la segregación lateral de microdominios ordenados de DPPC (lípido saturado) en su entorno. El incremento en la anisotropía del DPH en membranas que contienen AChR, Chol o ambos, corrobora, desde otro vértice, el hallazgo anterior y sugiere, además, un efecto aditivo de ambos en la formación de un microentorno lipídico más rígido y ordenado. La notable disminución de la fluorescencia del excímero de PyPC indica una difusión restringida de la sonda en presencia del AChR. Los estudios de transferencia de energía (FRET) desde la proteína hacia el DPH indican asimismo que el AChR se localiza predominantemente en microdominios lipídicos ordenados, enriquecidos en los lípidos saturados de cada sistema (DPPC o POPA) y segregados de las fases líquidas respectivas (DOPC o POPC). Evidencias sobre una posible competencia entre Chol y POPA por iguales sitios de unión en la proteína, sugieren que la capacidad del AChR para organizar una matriz lipídica más rígida y ordenada en su microentorno no depende sólo de las cabezas polares y ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, sino también de interacciones específicas fosfolípido-proteína.

1017b. (7965) EL ESTRÉS CRÓNICO Y LA LUZ CONTINUA DURANTE LA GESTACIÓN DETERIORAN LA SINCRONIZACIÓN MATERNA DEL RELOJ CIRCADIANO FETAL. ABRAMOR, NF; PONCE, RH; CÁCERES PUZZELLA, PS; VAQUÉ, AM; VERMOUTH, NT

Ciencias Médicas. Facultades de Odontología y Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

El sistema circadiano desempeña una función homeostática y conforma un circuito neuroendocrino que regula los procesos diarios bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento. En estudios previos demostramos que la glándula pineal y su hormona melatonina participan en la sincronización materna de los ritmos de alfa amilasa y de conducta de bebida. El objetivo de este estudio fue conocer si la sincronización del reloj circadiano en las crías podría ser afectada por situaciones de estrés crónico o de luz continua experimentadas por la madre durante la gestación. Se utilizaron ratas preñadas sometidas a un modelo de estrés crónico multivariado o de luz continua (LL) a partir del día 10 y hasta el 21 de preñez. A los 21 días de gestación las madres se trasladaron a oscuridad constante y se mantuvieron en esa condición durante todo el experimento, al igual que sus crías. Como control se utilizaron crías de madres no tratadas. Se realizó la

determinación de actividad alfa-amilasa en homogeneizados de glándulas parótida y submandibular de crías de 28 días de edad. El registro de conducta bebedora se realizó durante tres semanas comenzando en el día del destete. Los datos fueron analizados por el método de Cosinor y por estadística Circular. No se observa ritmo circadiano de alfa-amilasa, tanto en crías nacidas de madres estresadas como sometidas a LL prenatalmente, debido posiblemente a una disminución del grado de sincronización entre las crías individuales. Estos hallazgos se correlacionan con una distribución dispersa de fases y períodos del ritmo de conducta de bebida que es significativamente diferente de la distribución del grupo control. En conclusión, nuestros resultados sugieren que el deterioro de la sincronización materna de los ritmos circadianos estudiados sería consecuencia de una modificación en la transferencia del ritmo circadiano de melatonina, producida por efecto del estrés crónico o la luz continua, durante la segunda etapa de la gestación.

1018. (7968) LA MELATONINA IMPIDE LA HIPERTERMIA AGUDA INDUCIDA POR EL LPS EN LA TRANSICIÓN OSCURIDAD-LUZ EN EL HÁMSTER DORADO. SCACCHI, PABLO A.; BRUNO, VERÓNICA; PÉREZ LLORET, SANTIAGO; NICO, ANGELES; TAQUINI, VICTORIA; CARDINALI, DANIEL; CUTRERA, RODOLFO

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

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si las variaciones producidas sobre la temperatura corporal como consecuencia de la administración de LPS en las transiciones luz-oscuridad (ZT 12) y oscuridad-luz (ZT 22) pueden ser modificadas por el tratamiento previo con melatonina (MT). Para ello, hámsteres dorados (machos, adultos, n= 8 por grupo) fueron alojados en jaulas individuales bajo un fotoperíodo de 14:10 LO. La mitad de los animales recibió MT en el agua de bebida (25 ug/ml), durante los 15 días previos a la inyección luego de lo cual se administró LPS (30 ug/kg, i.p.) o solución salina, conformándose los siguientes grupos: agua-salina; MT-salina; agua-LPS; MT-LPS. La temperatura corporal fue monitoreada continuamente (Dataquest III- Minimitter, Circadia), analizándose las 5 primeras horas postratamiento (efecto agudo) y el ritmo de temperatura de los 5 días postratamiento (efecto a mediano plazo). A ZT 22 la melatonina impidió el aumento de la temperatura corporal provocado por la inyección de LPS (p=0.004) mientras que a ZT 12 no hubo cambios significativos. El análisis del ritmo de temperatura tampoco mostró cambios a ZT12. En cambio, a ZT22 se evidenció una tendencia a contrarrestar el aumento del mesor del ritmo producido por la endotoxina, no alcanzando ésta significación estadística. Los resultados indican que el tratamiento previo con melatonina impide la hipermia aguda inducida por el LPS en la transición oscuridad-luz (comienzo del período de reposo en esta especie), sinergizando el efecto reparador del sueño.

1019. (8103) STRESS OXIDATIVO INDUCIDO POR HIPOXIA/REOXIGENACIÓN EN EL SNC EN DESARROLLO: MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NNOS. GIUSTI, SEBASTIÁN; CONVERSO, DANIELA; PODEROSO, JUAN JOSÉ; FISZER DE PLAZAS, SARA

Instituto de Biología Celular y Neurociencias «Prof. Dr. E. De Robertis» Facultad de Medicina. Laboratorio Metabolismo del Oxígeno. Hospital de Clínicas

El SNC en desarrollo es especialmente sensible a los daños inducidos por la disminución en la tensión de oxígeno. Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, cuya formación puede inducirse por eventos de hipoxia/reoxigenación, intervienen en procesos de amplificación del daño modulando la expresión y/o actividad de enzimas, y produciendo daños oxidativos en macromoléculas. El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la modulación de la expresión de la enzima nNOS y medir indicadores de stress oxidativo en el lóbulo óptico de embriones de pollo en el día embrionario (DE) 12 sometidos a una hipoxia

aguda prenatal (8% [O₂, 60 min.) seguida de distintos tiempos de reoxigenación: 1hs., 2hs., 3hs., y 4hs. Se cuantificó la expresión de nNOS en fracciones citosólicas y mitocondriales mediante la técnica de Western blot. Como indicadores de stress oxidativo de midieron los cambios en la actividad del Complejo Respiratorio IV mediante la producción de citocromo c oxidado a 550 nm y la proporción de proteínas nitrosiladas por Western blot. Los resultados obtenidos muestran un aumento máximo en la expresión de nNOS durante la hipoxia y la primera hora de reoxigenación volviendo a valores normales en los tiempos posteriores. Este aumento fue de 37% en la fracción citosólica y de menor magnitud en la fracción mitocondrial. Además, se observó un aumento en la actividad del Complejo IV del 40% ($p < 0.007$) en tiempos coincidentes con el aumento de la expresión de nNOS. Por último, en el análisis de nitrosilación de proteínas se observa durante los tiempos de reoxigenación un aumento de la intensidad de las bandas y la aparición de bandas nuevas. En conclusión, los resultados muestran que los eventos de hipoxia/reoxigenación inducen un aumento en la expresión de nNOS en citosol y mitocondrias. El aumento concomitante de óxido nítrico se asocia a la activación del Complejo IV y al aumento en la nitrosilación de proteínas.

1020. (8125) EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAHIPOCAMPAL POST-ENTRENAMIENTO DE MT3 (ANTAGONISTA M4) SOBRE LA EVOCACIÓN DE LA MEMORIA DE EVITAMIENTO INHIBITORIO. QUILLFELDT, J A(1); JERUSALINSKY, D(2); LANZIOTTI, V B(1); ALVARES, L DE O(1); HENRIQUES, T P(1); GENRO, B P(1); OLIVEIRA, L F DE(1); CAMBOIM, C(1); DIEHL, F(1)

LPBNC, Dpto de Biofísica, IB / UFRGS, Brasil. (1)LPBNC, Dpto de Biofísica, IB/UFRGS, Brasil. (2)IBC&N Prof E De Robertis, Fac Med, UBA, Argentina.

Los receptores muscarínicos, presentes en interneuronas gabaérgicas hipocámpales, son moduladas por fibras colinérgicas originadas, en principio, en el septum medial. Utilizamos la toxina muscarínica MT3, un antagonista muy selectivo para M4, para investigar el rol de esos receptores del hipocampo en la consolidación de memorias aversivas y su interacción funcional con el sistema gabaérgico. Ratas Wistar (53) machos fueron implantadas con cánulas bilateralmente en la amígdala y, después de recuperarse de la cirugía, fueron entrenadas en una tarea de evitamiento inhibitorio (EI; shock 0,5 mA / 3 s; tiempo máximo en el test: 180s). Después del entrenamiento, recibieron la infusión 0,5µl por hipocampo, de MT3 (2µg)+PBS(Buffer Fosfato-Salina), de MT3 (2µg)+Bicuculina (0,0033µg), o de 1µl del vehículo PBS; el test se realizó después de 24h, sin administrar shock. Registramos una diferencia significativa en las latencias de los tests entre los grupos ($p = 0,040$, Kruskal-Wallis): la latencia del test del grupo MT3+PBS (19[17,25/19,25], $n = 12$, expresados como mediana con sus rangos intercuantiles [IQ25/IQ75]), pero no la del grupo MT3+bicuculina (55[16,25/180], $n = 13$), fué significativamente diferente de la del grupo control (vehículo PBS, 129 [28/180], $n = 16$), respectivamente con $p = 0,011$ y $0,475$ (Mann-Whitney). Nuestros resultados evidencian una interacción funcional entre los sistemas colinérgico y gabaérgico en el hipocampo para la consolidación de la memoria, donde el primero controla al segundo de manera serial, ya que la bicuculina, en dosis carentes de un efecto propio, fué capaz de impedir el efecto amnésico de la MT3. Financiado por: CNPq, CAPES, FAPERGS y PROPESQ / UFRGS (Brasil); IFS (Suecia).

ONCOLOGÍA 4: PROLIFERACIÓN Y ANGIOGENESIS

1021. (7203) LOS MACRÓFAGOS DE PORTADORES DEL TUMOR LMM3 INDUCEN ANGIOGENESIS Y LINFOANGIOGENESIS. DE LA TORRE, EULALIA; DAVEL, LILIA; SALES, MARÍA ELENA

Area Investigación, Instituto de Oncología A. H. Roffo. Facultad de Medicina, UBA.

La angiogénesis y la linfoangiogénesis son dos procesos complementarios de fundamental importancia en la progresión tumoral. Durante la angiogénesis se generan nuevos vasos sanguíneos, a partir de otros preexistentes, que permiten el crecimiento de la masa tumoral y su diseminación por vía hematogénea. La linfoangiogénesis, en cambio, consiste en la brotación de células linfáticas a partir de células endoteliales venosas para formar una red vascular que facilita la metástasis vía linfática. Previamente demostramos que los macrófagos (Mfs) peritoneales provenientes de portadores de células LMM3 (línea derivada de un adenocarcinoma mamario murino) potencian la respuesta angiogénica inducida por dichas células tumorales. Los MfsT (3×10^5) de 7 y 14 días de portación (MfsT7 y Mfs T14) inducen una respuesta angiogénica positiva (n° de vasos/mm²) ($2,34 \pm 0,06$ y $3,61 \pm 0,49$) ($n = 5$) con respecto al control inoculado con MfsN ($1,75 \pm 0,20$) ($n = 9$), que corroboramos con el estudio de la molécula CD31, marcadora de neovasos sanguíneos. Por ensayos de Western blot (Wb) (DO/mm²) los MfsT7 y MfsT14 muestran un incremento en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) de tipo A del 100% ($0,307$ y $0,310$ respectivamente) con respecto a los Mfs normales (MfsN) ($0,150$). También se observa la inmunomarcación de proteínas de 22,6 kDa y 20,4 kDa con un anticuerpo específico para VEGF-C en MfsT7 ($0,070$ y $0,140$) y T14 ($0,081$ y $0,105$) ausentes en MfsN. Simultáneamente, estudiamos por Wb en el sitio inoculado con Mfs, la expresión del receptor de ácido hialurónico, LYVE-1, como marcador de linfoangiogénesis y observamos un incremento del 38,2% en la expresión de esta proteína sólo con MfsT7 ($2,368$) con respecto al control (MfsN:1,713). Concluimos que los Mfs obtenidos de portadores de tumor de 7 días constituyen un estímulo potente para desencadenar una respuesta angiogénica y linfoangiogénica in vivo.

1022. (7238) LA DESMOPRESINA (DDAVP) MODIFICA LA PRODUCCIÓN DE ANGIOSTATINA Y REDUCE LA ANGIOGENESIS INDUCIDA POR CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS. RIPOLL, GISELLE VANINA; GIRÓN, SANTIAGO; TEJERA, AGUEDA MERCEDES; GOMEZ, DANIEL EDUARDO; ALONSO, DANIEL FERNANDO

Laboratorio de Oncología Molecular. Universidad Nacional de Quilmes.

La angiostatina es un potente inhibidor de la angiogénesis. Es un fragmento interno de la molécula de plasminógeno producido a través del clivaje por activadores de plasminógeno (uPA y tPA), generándose primero plasmina y luego angiostatina. Células de cáncer mamario, melanoma y otras variantes tumorales secretan altas cantidades de uPA o tPA. DDAVP es un análogo de la vasopresina, que induce la liberación de tPA en el endotelio. Previamente demostramos que DDAVP tiene una acción antitumoral, reduciendo la diseminación metastásica en el modelo F3II de carcinoma mamario murino. Estudiamos si DDAVP es capaz de modificar la producción de angiostatina e inhibir la angiogénesis inducida por células tumorales. Medios condicionados durante 48 h por monocapas semiconfluentes de cáncer mamario (F3II, MCF7) y melanoma (B16, SKMel), tratadas o no con DDAVP, se incubaron en presencia de plasminógeno purificado ($1 \mu\text{g/ml}$) y se evaluó la producción de angiostatina mediante Western blot. DDAVP (100 ng/ml) aumentó la capacidad de producción de angiostatina de las células de cáncer mamario pero no de las de melanoma. La mayor producción se observó luego de 30-40 h de incubación en presencia de plasminógeno, distinguiéndose dos bandas características de 35 y 40 kDa. La angiogénesis in vivo se evaluó en el modelo F3II inyectando 200.000 células tumorales mamarias viables bajo la piel de ratones Balb/c tratados o no con DDAVP ($2 \mu\text{g/kg}$ i.v. diariamente, durante 5 días) y se midió la densidad vascular alrededor del sitio de inoculación. DDAVP redujo significativamente la angiogénesis tumoral (Control: $5,7 \pm 0,40$ versus DDAVP: $3,16 \pm 0,14$ vasos/mm²; $p < 0,03$). Los efectos de la DDAVP sobre la producción de angiostatina podrían estar asociados a sus propiedades antiangiogénicas y antimetastásicas observadas en modelos murinos.

1023. (7334) EXPRESIÓN DEL VEGF EN TUMORES HIPOFISIARIOS INDUCIDOS POR ESTRÓGENOS. SU COMPARTIMENTALIZACIÓN SUBCELULAR Y CORRELACIÓN CON FGF-2. MUKDSI, JORGE; DE PAUL, ANA; AOKI, AGUSTIN; TORRES, ALICIA

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

Introducción: El Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), regula el crecimiento de células endoteliales, permeabilidad vascular y la expansión tumoral. Objetivo: Localizar a nivel ultraestructural el VEGF y cuantificar su expresión en hipófisis de rata normales y tumorales. Correlacionar su expresión con la del FGF-2 y la proliferación de células lactotropas. Materiales y métodos: Ratas Wistar machos controles y estimuladas con estradiol por 7, 20 y 60 d (n 15/grupo). Se realizó inmunocitoquímica por microscopía electrónica (ME) y western blot de homogenatos hipofisarios (fracciones nucleares y citoplasmáticas). La expresión del VEGF se correlacionó con isoformas de alto y bajo peso molecular del FGF-2 y la proliferación de células lactotropas (Pearson. ANOVA-Tukey). Resultados: VEGF se inmunodetectó en grupos controles y estimulados. Se localizó en núcleo, RER, Golgi y gránulos secretorios de células lactotropas, somatotropas y gonadotropas. La expresión del VEGF en los homogenatos evidenció un incremento significativo ($p < 0.001$) entre los diferentes tiempos de efecto hormonal y respecto al grupo control. No se demostró asociación entre la expresión de VEGF en las fracciones analizadas. Se observó correlación significativa ($p < 0.05$) entre VEGF citoplasmático y la isoforma de 18kDa del FGF-2 no evidenciándose correlación con la proliferación de células lactotropas ($p > 0.05$). La identificación por ME de VEGF en núcleo y citoplasma de células secretorias adenohipofisarias demuestra la existencia de diferentes mecanismos de regulación de la formación vascular en la glándula normal y tumoral. Los análisis de correlación realizados demuestran que VEGF no participaría en la regulación del proceso proliferativo de lactotropas, actuando directamente sobre la neovascularización.

1024. (7433) FLAVONOIDES QUE INHIBEN LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LÍNEAS TUMORALES HUMANAS Y MURINAS. CÁRDENAS, MARIANO; BLANK, VIVIANA; MARDER, MARIEL; ROGUIN, LEONOR

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires.

En un trabajo previo demostramos la acción antiproliferativa de un conjunto de flavonoides naturales y sintéticos sobre el crecimiento de células derivadas de un carcinoma cervical humano (WISH). Este estudio se hizo extensivo a otras líneas de células tumorales de origen humano (KB, carcinoma faríngeo; HeLa, adenocarcinoma cervical; SK-MEL-28, melanoma) y murino (F3II, tumor mamario, B16, melanoma). Las células 3T3 de embrión de ratón se utilizaron como control. El flavonoide natural más activo fue apigenina en células HeLa y Kb ($IC_{50} \sim 6-4 \mu M$), seguido por crisina en las mismas líneas tumorales ($IC_{50} \sim 13 \mu M$). Entre los flavonoides sintéticos, un éster del ácido cafeico fue efectivo en inhibir el crecimiento de todas las líneas ensayadas ($IC_{50} \sim 2-16 \mu M$), mientras que derivados nitrados de flavona mostraron una especificidad más restringida. Así, los melanomas fueron resistentes a la acción de nitroderivados, aunque algunos fueron potentes citostáticos, esencialmente en los restantes tumores humanos. Ninguno de los flavonoides probados afectó el crecimiento de células no neoplásicas (3T3). Los resultados obtenidos muestran que ciertos flavonoides sintéticos se comportaron como agentes antitumorales efectivos, de espectro más amplio que los compuestos naturales. La alta susceptibilidad de las células tumorales a la acción antimitogénica de algunos de estos compuestos en ciertos carcinomas sugieren la potencial utilidad terapéutica de los mismos.

1025a. (7439) EFECTO IN VITRO DE LA FORMA TRANS DEL ÁCIDO RETINOICO (ATRA) SOBRE LÍNEAS TUMORA-

LES MURINAS DE MAMA (LM38, LM05, LM3) Y PULMÓN (LP07). VELOSO, MJ; TODARO, L; PURICELLI, L; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA

Área de Investigación del Instituto de Oncología Angel H. Roffo. Av. San Martín 5481, Buenos Aires

Los ácidos retinoicos (AR) son moléculas de señalización que modulan procesos de homeostasis, proliferación, diferenciación y muerte celular. Varias evidencias apoyan la idea de que el sistema del AR puede interferir con la oncogénesis inhibiendo el crecimiento tumoral. Actualmente diversos componentes de este sistema están siendo utilizados en el tratamiento de leucemias induciendo a las células a la diferenciación y apoptosis. Sin embargo se conoce poco sobre el papel del AR en la progresión de los tumores sólidos. Nuestro objetivo fue estudiar la acción biológica del ATRA sobre las líneas tumorales mamarias (LM05, LM38 y LM3) y la línea de adenocarcinoma de pulmón (LP07), desarrolladas en el Área de Inv del Inst. Oncol. Roffo. El tratamiento con ATRA (0.001–10 μM) indujo en todas las líneas una disminución dosis dependiente de la proliferación celular medida por actividad metabólica (MTS) y/o recuento ($p < 0.05$). Las células LM3, LM05 y LP07 aumentan de tamaño por el tratamiento, no observándose aumento de células apoptóticas. En contraposición, las líneas LM38 presentaron un aumento de la apoptosis en las células tratadas (6 cél/campo vs 0,5 del control). Por otro lado, ATRA moduló el fenotipo morfológico induciendo aumento de Cadherina E en LM05 y LM38, así como la reorganización del citoesqueleto de citoqueratina y actina en todas las líneas estudiadas. Además favoreció la capacidad adhesiva de las células LM38 y LP07 ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos, convierten a nuestras líneas tumorales, con diferente capacidad de crecimiento y diseminación in vivo, en una herramienta importante para el estudio de las vías inducidas por AR asociadas con la diferenciación y la apoptosis.

1025b. (7442) INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR Y APOPTOSIS INDUCIDA POR DISTINTOS FLAVONOIDES EN CÉLULAS DE UN ADENOCARCINOMA CERVICAL HUMANO (HELA). CÁRDENAS, MARIANO; BLANK, VIVIANA; MARDER, MARIEL; ROGUIN, LEONOR

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires.

Previamente demostramos que los flavonoides naturales crisina y apigenina, y algunos flavonoides sintéticos, como ésteres del ácido cafeico y derivados nitrados de flavona, se comportan como potentes inhibidores del crecimiento de células provenientes de un adenocarcinoma cervical humano (HeLa). Con el propósito de explorar los mecanismos de acción antitumoral de estos compuestos, evaluamos la capacidad de los mismos de inducir apoptosis midiendo la expresión de fosfatidilserina en la membrana plasmática (anexina V) y el contenido de ADN hipodiploide por técnicas de citofluorometría. Luego de incubar las células HeLa durante 24 horas con distintos flavonoides, se observó que la proporción de células en apoptosis temprana (células positivas para anexina V) incrementó significativamente en presencia de los compuestos activos (ej: 9% control vs. 42% nitroderivado de flavona). Los flavonoides activos también aumentaron el porcentaje de células hipodiploides en función del tiempo de incubación (ej: 26% control vs. 66% nitroderivado de flavona a las 48 horas). Asimismo, obtuvimos un patrón de fragmentación típica del ADN cromosomal mediante electroforesis en geles de agarosa, y determinamos la presencia de células con morfología apoptótica por microscopía de fluorescencia (tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio). Los resultados obtenidos indican que la acción antiproliferativa de algunos flavonoides naturales y sintéticos en células HeLa está estrechamente relacionada con la inducción de apoptosis. Los intermediarios involucrados en el proceso de muerte celular programada están siendo evaluados.

1026. (7710) ANALISIS DE LA ANGIOGÉNESIS Y MACRÓFAGOS ASOCIADOS A UN MELANOMA PRO-

DUCTOR DE MCP-1. GAZZANIGA, S (1); BRAVO, AI (2); TRINCHERO, A (3); MASCHI, F (4); MORDOH, J (3,5); WAINSTOK, R (1)

(1)Dpto. Química Biológica, 4º piso, pab II, Ciudad Universitaria, FCEyN, UBA (2) Htal.E. Perón; (3) Fund. I. Leloir; (4) Fac.Cs.Veterinarias, La Plata; (5) FCEyN,UBA

En trabajos previos hemos reportado que la línea de melanoma humano IIB-MEL-J transfectada con un plásmido codificante de la quimioquina MCP-1 produce tumores de mayor tamaño, con aumento en el reclutamiento de macrófagos (M) al sitio tumoral y de la capacidad metastásica. En el presente trabajo reportamos un análisis más detallado del inmunofenotipo de los M presentes y su relación con la vascularización. En estadios tempranos (2 días) los tumores MEL-J-MCP-1 presentan un marcado cordón periférico de vasos incipientes y acúmulos de células CD31+ de núcleos picnóticos, junto a importante presencia de M peritumorales F4/80+ pero de expresión leve para el marcador CX3CR (receptor de fractalquina, indicador de M residentes). Cuando el tumor se ha establecido (11 días) observamos en 10 campos de 100X los siguientes recuentos totales:

	Vasos peritum.	Vasos intratum.	Clusters CD31+ peritum.	Clusters CD31+ intratum.	M F4/80+ peritum.	M F4/80+ intratum.	M CX3CR+ peritum.	CX3CR+ intratum. M
IIB-MEL-J-MCP-1	+++	+++	+++	+++	242	140	37	35
IIB-MEL-J	+++	-	+++	-	174	2	42	0

Para evaluar el compromiso de los M en la promoción del crecimiento de este melanoma, se procedió a la depleción de M con clodronato, lo que produjo una reducción del volumen tumoral >70% ($1,6 \pm 0,6$ vs $0,29 \pm 0,24$ cm³; $p=0,002$). La angiogénesis en los tumores provenientes de ratones deplecionados mostró vasos con perímetros < a los no tratados ($64,57 \pm 5,86$ vs $128,12 \pm 9,13$ μ m; $p=0,003$). La línea control no presentó cambios frente al tratamiento (< 0,2 cm³). En conclusión, la producción de MCP-1 en este modelo de melanoma humano convoca un claro aumento de M F4/80+ intratumorales que serían los responsables de la profusa angiogénesis, que promueve un mayor crecimiento, carente de necrosis. Los M intratumorales CX3CR+ estarían acompañando este proceso. Los M y vasos peritumorales parecen ser menos dependientes de MCP-1, lo que deberá ser estudiado en mayor detalle.

1027. (7996) RESISTENCIA A MULTIDROGAS (MDR) E INDUCCIÓN DE APOPTOSIS A TRAVÉS DE NFKB Y FOSFORILACIÓN DE BCL2. GARCIA, MARIANA; ALANIZ, LAURA; BLANCO, GUILLERMO; ALVAREZ, ELIDA; HAJOS, SILVIA

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, CONICET

Existen diferentes factores que condicionan MDR: eflujo de drogas a través de Pgp, activación de sistemas de detoxificación o alteraciones en proteínas involucradas en la apoptosis. MDR puede modularse con inhibidores de Pgp, por inhibición de las vías de supervivencia como NFKB o por inducción de apoptosis. La fosforilación de Bcl2 se correlaciona tanto con la inducción de apoptosis como con su función antiapoptótica, dependiendo del tipo celular. El objetivo de este trabajo fue estudiar la modulación de MDR a través de NFKB y la fosforilación de Bcl2 en líneas resistentes a doxorubicina (DOX) y vincristina (VCR) obtenidas en nuestro laboratorio. Las líneas resistentes LBR-D y LBR-V presentaron mayor actividad constitutiva de NFKB que la línea sensible LBR- analizado por EMSA. Al evaluar la apoptosis por microscopía de fluorescencia y AnnexinV se observó que el tratamiento con un inhibidor específico de NFKB, BAY 11-7082, indujo mayor apoptosis en LBR-D ($32,12 \pm 9,55$)% y LBR-V ($64,06 \pm 9,58$)% que en LBR- ($15,32 \pm 3,77$)%. Cuando se evaluó la inducción de apoptosis y su relación con la fosforilación de Bcl2 (pBcl2) por western blot se encontró que en LBR- la apoptosis

fue de $54\% \pm 7,4\%$ luego del tratamiento con VCR y aumento de pBcl2, $74\% \pm 4,2\%$ con DOX sin variación de pBcl2, $77,7\% \pm 0,9\%$ con CsA (1μ g/ml) sin pBcl2 y ausencia de apoptosis ($4,8 \pm 3,9$)% con PSC833. En LBR-D sólo CsA indujo apoptosis ($77,7 \pm 3,6$)% sin modificación de pBcl2 y en LBR-V sólo PSC833 ($24,6 \pm 6,8$)% con aumento de pBcl2. En LBR-D la modulación de Pgp con CsA ($0,1 \mu$ g/ml) indujo apoptosis con VCR y DOX similar a LBR- y aumento de pBcl2 con VCR, hecho que no ocurrió en LBR-V. Se concluye que en las líneas resistentes es posible inducir apoptosis inhibiendo la actividad constitutiva de NFKB. La pBcl2 se correlaciona con la inducción de apoptosis por VCR y PSC833 y no por DOX y CsA.

1028. (8009) EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y GENOTIPO DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ASOCIADO A TUMORES KRÜPPEL-LIKE KLF6 EN CÉLULAS NORMALES Y TUMORALES. GEHRAU, RICARDO; D'ASTOLFO, DIEGO; ROMERO, NAHUEL; MORON, GABRIEL; KORITSCHONER, NICOLÁS

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología CIBICI-CONICET, FCQ-UNC Córdoba

El factor de transcripción KLF6 se induce durante la proliferación y diferenciación celular, mientras que su expresión aberrante está asociada con la formación de tumores. El objetivo central fue investigar el genotipo, expresión y localización subcelular de KLF6 en diferentes células tumorales y evaluar sus consecuencias sobre potenciales genes target que controlan la proliferación celular. Se aplicaron las metodologías de RT-PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo e inmunoblot para evaluar tejidos y células tumorales (carcinoma de mama, $n=60$ y otros tejidos, $n=25$ que incluye alteraciones hematopoyéticas). Se investigaron: (1) la expresión del gen KLF6; (2) la localización subcelular de la proteína KLF6; (3) la correlación con marcadores tumorales (erbB2); (4) el genotipo de KLF6 en células de cáncer de mama y (5) el impacto de la sobreexpresión de KLF6 sobre proteínas reguladoras del ciclo celular. En tumores de mama se detectó un patrón específico de marcación para KLF6 que se correlacionaba en forma directa con el nivel de expresión de erbB2 ($X(2)=17,48$; $P<0,005$). Mediante secuenciación del gen KLF6 se determinaron variaciones alélicas en células de cáncer de mama MCF7 y T47D. En MCF-7, KLF6 aparece concentrada en el núcleo mientras que en T47D está presente también en el citoplasma. La expresión inducible de KLF6 provocó que ciertas proteínas reguladoras del ciclo celular incrementaran (p27, p21, ciclina D1, D3) mientras otras no se modificaron (c-myc, cdc25, DNA-pol). 1-KLF6 es predominantemente nuclear en carcinoma mamario donde interaccionaría con promotores de genes target. 2-Mutaciones en KLF6 no alterarían su localización. Otra mutación (212Thr>Pro) implicaría un cambio conformacional en KLF6 que podría afectar su función. 3-KLF6 modularía un grupo de genes reguladores de proliferación celular emergiendo como un nuevo indicador del nivel de agresividad tumoral.

ONCOLOGÍA 5: CLÍNICA, TERAPÉUTICA Y MARCADORES TUMORALES

1029. (6887) MECANISMOS DE INCORPORACIÓN DE LOS DERIVADOS DE ÁCIDO 5-AMINOLEVÚLICO EN CÉLULAS DE MAMÍFERO. RODRIGUEZ, LORENA; CASAS, ADRIANA; DANIEL, HANNELORE; MACROBERT, ALEXANDER; BATLLE, ALCIRA

CIPYP, CONICET-UBA; Centro Nacional de Lasers, UK; Universidad Tecnica de Munich, Alemania

El ácido 5-aminolevúlico (ALA) es el precursor de la Protoporfirina IX, fotosensibilizante ampliamente usado en la Terapia Fotodinámica del cáncer. En los últimos años se han sintetizado derivados lipofílicos del ALA con el objeto de aumentar la penetración a través de las membranas celulares. Con tal pro-

pósito, hemos sintetizado los ésteres de ALA: Metil-ALA, Hexil-ALA, Undecanoil-ALA y ALA-2-(hidroximetil)tetrahidropiraniol ester, además del dendrímero aminometano tris metil ALA, macromolécula que contiene 3 residuos de ALA. El objetivo de este trabajo ha sido elucidar, mediante estudios de competencia con 14C-ALA, los mecanismos de transporte de estos derivados de ALA en dos sistemas: a) células tumorales LM3 que incorporan ALA por sistema de transportadores BETA, b) levaduras *Pichia Pastoris* que expresan el transportador renal PEPT2. Se ha encontrado que los ésteres de ALA Hexil y Undecanoil comparten con el ALA en las células LM3 el sistema de transporte mientras que Metil y ALA-2-(hidroximetil)tetrahidropiraniol ester y el dendrímero de ALA, no compiten por la incorporación de ALA. Sin embargo, estudios de síntesis de Protoporfirina IX con preincubación en presencia de estos derivados a 4°C, sugieren que Hexil-ALA y Undecanoil-ALA se incorporan además por difusión. En el sistema PEPT2, todos los compuestos, excepto el Metil-ALA, comparten con el ALA el mecanismo transportador. El conocimiento de los mecanismos de entrada de los derivados de ALA nos permitirá el diseño de derivados más eficientes para optimizar la Terapia Fotodinámica.

1030. (6899) ESTUDIOS PARA LA APLICACIÓN DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN PERROS CON CÁNCER INDIFERENCIADO DE TIROIDES (CIT) ESPONTÁNEO. DAGROSA, ALEJANDRA; JIMENEZ REBAGLIATI, RAÚL; VIAGGI, MABEL; CASTILLO, VÍCTOR; THOMASZ, LISA ; PEREZ, JUAN; CASTIGLIA, SILVIA; BATISTONI, DANIEL; CABRINI, RÓMULO; JUVENAL, GUILLERMO; PISAREV, MARIO

Comisión Nacional de Energía Atómica. Fac. de Veterinaria (UBA), Fac de Medicina (UBA)

El cáncer indiferenciado de tiroides humano (CIT) carece de tratamiento efectivo y la sobrevida de los pacientes no supera el año. En trabajos previos demostramos que la aplicación de BNCT al CIT es factible. Mostramos que línea humana de CIT (ARO) tiene una captación selectiva de borofenilalanina (10BPA) tanto in vitro como después de ser implantada en ratones nude (Thyroid 12:7, 2002). Por otro lado observamos que cuando estos ratones fueron también irradiados con un haz apropiado de neutrones se logró un 100% de control sobre el crecimiento tumoral y un 50% de cura histológica en tumores con un volumen inicial de 50 mm³ o menos (Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys 57: 1084-1092). Como un paso importante hacia la aplicación potencial de esta forma de terapia en humanos estudiamos seis perros con diagnóstico de CIT espontáneo. Estos animales fueron infundidos durante 60 min con una solución de 10BPA (0,14M) en una dosis de 50mg/Kg y a continuación se les realizó la tiroidectomía. Durante el procedimiento se tomaron muestras de sangre, tiroides normal y de distintas áreas de tumor para la medición de boro por el método de ICP-AES. Se observó una captación tumoral selectiva de BPA para todos los animales, con relaciones tumor/sangre que estuvieron entre 2,02 y 3,92, mientras la relación tumor/tiroides normal fue de 6,78. En muestras individuales se hallaron valores entre 0,33 y 8,36 que fueron correlacionados con los dos patrones histológicos observados: tumores homogéneos y heterogéneos. Estos resultados obtenidos en perros con CIT espontáneo confirmaron la selectividad de BPA por este tipo de tumor y nos permiten planificar la aplicación de BNCT en estos animales para una posterior aplicación en humanos.

1031. (6974) ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA Y STATUS DE INTEGRACIÓN DE HPV 16 Y 18 EN LESIONES DE CERVIX. MONTANI, ROMINA; MAURO, ELIDA (1); LEIRÓS, GUSTAVO; STELLA, INÉS; VILLAR, VERÓNICA; BRECCIA, MÓNICA (1); GUGLIELMINETTI, ARMANDO (1); PESARESI, MARIO (1); SCHWARZ, ELISABETH (2); EIGUCHI, KUMIKO

Cat.Bioq. e Inmunol-Fac.Med.-USAL. (1) Servicio de Tocoginecología-Hospital Durand, (2) DKFZ-Heidelberg-Alemania

Introducción: Se conoce la necesidad de la expresión continua de los oncogenes E6/E7 de HPV de alto riesgo en el mantenimiento del fenotipo maligno de cervix. La integración del DNA viral mostró incrementar la expresión de estos oncogenes, y la estabilidad de sus mRNAs. **Objetivo:** evaluar la expresión de HPV 16/18 y la integración del genoma viral en lesiones de alto y bajo grado de cervix. **Materiales y métodos:** Se analizaron 15 lesiones de cervix: 9 de alto grado (CIN III y Carcinomas invasivos), y 6 de bajo grado (CIN I y II) de pacientes de Buenos Aires. La detección y tipificación de DNA de HPV fue realizada por PCR-Consensus y Tipo específica, la expresión del oncogen E7 de HPV 16 y 18 por RT-PCR y la integración genómica viral por APOT. **Resultados:** Todas las muestras analizadas mostraron DNA de HPV. Por PCR-TS, 4/6 (66%) lesiones de bajo grado y 7/9 (78%) de alto grado presentaron HPV 16 y 2/9 (22%) lesiones de alto grado HPV 18. Ninguna lesión de bajo grado expresó HPV 16/18, imposibilitando evaluar la integración viral por APOT. De las 7 lesiones de alto grado que expresaron HPV 16, 5 (71%) presentaron transcriptos del genoma integrado, 2 (29%) del genoma integrado y episomal, y ninguna exclusivamente episomal. De las 2 muestras de alto grado que expresaron HPV 18, 1 mostró solo transcriptos de la forma integrada, y la otra solo episomal. **Discusión:** Se ha visto expresión de HPV 16/18 sólo en lesiones de alto grado, con un 100% de integración de HPV 16 y 50% de HPV 18. Pese al escaso tamaño muestral, los resultados indicarían un status de integración viral en lesiones de alto grado no visto en las de bajo grado y que estaría asociado a la expresión de E6/E7. El desarrollo de técnicas de detección de integración de HPV permitirá complementar el diagnóstico patológico y la prognosis, particularmente, en lesiones de bajo grado.

1032. (7157) TERAPIA FOTODINÁMICA A PARTIR DE ALA Y ÓXIDO NÍTRICO. DIVENOSA, GABRIELA; CASAS, ADRIANA; PEROTTI, CHRISTIAN; BATLLE, ALCIRA; FUKUDA, HAYDEE

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias

La Terapia Fotodinámica basada en ALA (ALA-TFD) es una modalidad terapéutica anticancerígena en la que la excitación lumínica del agente fotosensible (porfirinas sintetizadas endógenamente a partir de ALA), produce especies citotóxicas que destruyen el tejido maligno. En este trabajo estudiamos la interacción entre el ALA-TFD y el óxido nítrico (NO), molécula mensajera altamente reactiva, empleando las líneas tumorales LM2 (no productora de NO), LM3 (productora de NO) y SNP-LM3, derivada de esta última y resistente al donador de NO nitroprusiato de sodio (SNP), todas ellas provenientes del Instituto AHRoffo. LM3 y SNP-LM3 producen cantidades similares de NO (8,2±0,45 y 8,5±0,51 nmol NO(2-) respectivamente, medido con el reactivo de Griess). La síntesis de porfirinas a partir de ALA 0,6 mM y 3 h de incubación fue 40 µg/10⁵céls para las células LM3 y SNP-LM3, y 21 µg/10⁵céls para las LM2. Frente al tratamiento de ALA-TFD, las dosis de luz letales LD50 fueron 0.047, 0.10 y 0.27 J/cm², para LM2, LM3-SNP, y LM3 respectivamente. El SNP tuvo un efecto protector sobre el daño fotodinámico en las tres líneas celulares, el que se correlacionó con una marcada disminución de la síntesis de porfirinas causada por el SNP. Al inducir un aumento de los niveles endógenos de NO mediante tratamiento con arginina, no se modificaron los niveles de porfirinas ni la respuesta fotodinámica. El ALA estimuló la liberación de NO a partir de SNP tanto en células como en medios de incubación. Los resultados obtenidos sugieren que los niveles de NO pueden estar modulando la sensibilidad de las células al ALA-TFD.

1033. (7388) PATRON DE LOCALIZACION ALTERADO DE LA HO1 EN CANCER DE PROSTATA. SACCA, PAULA;

MEISS, ROBERTO (1); CASAS, GABRIEL (2); MAZZA, OSVALDO (2); BATLLE, ALCIRA; NAVONE, NORA (3); VAZQUEZ, ELBA (4)

CIPYP-CONICET. (1)Academia Nacional Medicina, (2)Hospital Alemán, (3)MDAnderson USA, (4)Química Biológica FCEN-UBA

La inflamación puede causar la destrucción de las células epiteliales de la próstata y aumentar la proliferación como respuesta a la muerte celular. La sobre expresión de la proteína antiinflamatoria HO1 durante la fase temprana del ciclo celular permitiría que la progresión proceda bajo condiciones protectoras a fin de asegurar la división normal. La inactivación de p27 es un evento temprano y frecuente en el cáncer de próstata (PCa) con fenotipo agresivo y estaría regulada a nivel post-transcripcional. Mientras p27 se localiza en el núcleo, la función de HO1 en este compartimento debe ser dilucidada y estaría relacionada con su fosforilación y con la transcripción de genes. Se realizó un análisis inmunohistoquímico de HO1 y p27 en muestras de pacientes con PCa. (n=28) e hiperplasia prostática benigna (BHP, n=11). Se utilizaron los Ab policlonales anti p27 y anti HO1 y un segundo Ab biotinilado. La reacción se visualizó usando streptavidina-biotina peroxidasa y DAB. Se consideraron positivos los casos con aparición de marca nuclear para HO1 y el cut off nuclear para p27 fue mayor o igual al 40%. El cut off para la marca citoplasmática de HO1 fue mayor o igual al 25% de las células. El resultado para la marcación de p27 en PCa fue 18/28 (64%) y en las BHP 7/11 (58%). Se encontró elevada marcación nuclear de HO1 en el tumor (19/28, 68%) en comparación con el tejido peritumoral y los casos de BHP (6/27, 22% y 2/11, 18% respectivamente, $p < 0.05$). En cambio, se hallaron niveles semejantes de marcación citoplasmática para el tumor (16/28, 57%) y para el tejido peritumoral (18/27, 67%), mientras que en BHP la expresión está disminuida (4/11, 36%, $p < 0.05$). La marcación nuclear de HO1 podría ser utilizada como un probable marcador biológico de PCa. La identificación de los efectos benéficos o adversos de la expresión de HO1 en un determinado cuadro clínico podría ser importante para proveer nuevas alternativas para controlar la inflamación usando estrategias genéticas o farmacológicas.

1034. (7429) GPC3 COMO MARCADOR DE PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA DE BAJO ESTADIO (EI Y EII).
PETERS, MARÍA GISELLE; IGLESIAS, BIBIANA; CAPURRO, MARIANA; FILMUS, JORGE; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA; PURICELLI, LYDIA

Area Investigación. Instituto de Oncología Angel H. Roffo

El glicoproteína-3 (GPC3), un proteoglicano unido a la membrana celular, se expresa ampliamente en tejidos embrionarios pero desaparece en la mayoría de los tejidos adultos, con algunas excepciones como la glándula mamaria. Varios estudios involucran a GPC3 con cáncer. Utilizando hibridación in situ y RT-PCR se determinó que el ARNm de GPC3 está disminuido en tumores de mama. Por lo tanto, decidimos estudiar la expresión y localización de GPC3 en tumores mamarios y compararla con la expresión en patologías mamarias benignas, mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal y la técnica de inmunohistoquímica (IHQ). Además, nos propusimos determinar la utilidad de GPC3 como marcador tumoral de pronóstico. Para ello, se analizó la expresión de GPC3 en 56 tumores de mama de bajo estadio (EI n=14 y EII n=42) y 23 casos de patologías benignas. Mediante análisis univariados, los datos obtenidos fueron relacionados con los parámetros de pronóstico utilizados en la clínica, así como también con la sobrevida libre de enfermedad (SLE). Por otro lado, se analizó también la asociación entre la expresión de GPC3 y otras moléculas alteradas en cáncer, como Ki 67, ciclina D1, E, B1 y los CDKs p16 y p21. El número de casos positivos para GPC3 fue muy bajo (10% para las patologías benignas y 20% para los tumores), no superando el 20% de células positivas para cada muestra. No se encontró asociación entre la expresión de GPC3 y los parámetros clínico-pato-

lógicos, ni con la expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular (Chi cuadrado y correlación de Perason). Finalmente, la curva de sobrevida Kaplan y Meier indicó que la expresión de GPC3 no es capaz de predecir el tiempo de SLE. En conclusión, en la patología mamaria benigna y maligna la expresión de GPC3 fue baja, no resultando de utilidad como marcador de pronóstico en pacientes con cáncer de mama de bajo estadio.

1035. (7509) EXPERIENCIAS INICIALES EN EL TRATAMIENTO ELECTROQUÍMICO (ECHT) DE TUMORES.
COLOMBO, LUCAS LUIS; FERNÁNDEZ SLEZAK, DIEGO; MOCSKOS, ESTEBAN; TURJANSKI, PABLO; MINSKY, DANIEL; VANZULLI, SILVIA INES

Dpto Inmunobiología, Area Investigación, Inst. A.H.Roffo, UBA. Dpto. Computación, FCEyN, UBA. Dpto.Física, CNEA-Constituyentes. IEO, Fund.Maissa, Acad.Nac.Med.

Introducción: La EChT es un tratamiento para tumores sólidos y superficiales que se conoce desde hace mucho tiempo, especialmente en China y en Suecia, usado con resultados muy alentadores en más de 10.000 pacientes, consistente en el pasaje de corriente eléctrica continua (CC) de baja intensidad a través del tumor. Objetivo: iniciar investigaciones tratando tumores subcutáneos en ratones para luego diseñar simulaciones numéricas en computadoras para perfeccionar estrategias de dosificación. Materiales y Método: 28 Ratones machos BALB/c portadores de tumores M3 sc de alrededor de 900 mm(3) fueron sometidos bajo anestesia general a EChT de 8V durante 10 min por sesión: 1er exp: 9 ratones, 3 controles (C) y 6 experimentales (Ex), 4 sesiones en días 12, 17, 19 y 21 post trasplante tumoral con CC entre 5 y 10 mA. C: ídem sin CC. 2do exp: 19 ratones, (4 C y 15 Ex), 14 sesiones (3 por semana) durante 35 días con CC entre 6 y 25 mA. Resultados. Exp.1: al sacrificar los ratones al día 21 post-trasplante, los tumores pesaron: C: $4.7 \text{ g} \pm 1.5$ (n=3), Ex: $1.3 \text{ g} \pm 0.8$ (n=6), $p < 0.02$. Exp. 2: al día 35 de tratamiento los pesos tumorales fueron: C: $12.3 \text{ g} \pm 4.2$ (n=4), Ex: $3.0 \text{ g} \pm 3.5$ (n=12), $p < 0.02$. El análisis histológico mostró signos de necrosis y electrocoagulación, así como una ausencia de tumor viable reemplazado por una gran costra en la mayoría de los experimentales. Conclusiones: La EChT puede ser eficaz, al menos en ratones, obteniéndose efectos destructivos del tejido tumoral. Este sería, a nuestro entender, el primer trabajo en EChT realizado en Argentina, y sirve de base para estudios de modelado matemático por computadora para el mejoramiento de los tratamientos.

1036. (7571) ROL DEL ANTÍGENO LEWIS X EN LA ADHESIÓN DE NEUTRÓFILOS Y CÉLULAS TUMORALES MCF-7 A ENDOTELIO. EFECTO CITOTÓXICO DE UN ANTICUERPO ANTI-LEWIS X SOBRE CÉLULAS MCF-7. ELOLA, MARÍA TERESA; VÁZQUEZ, PAULA; MORDOH, JOSÉ

Fundación Instituto Leloir. Buenos Aires.

El antígeno Lewis (Le) x se expresa en la superficie de neutrófilos (PMN) humanos y de células neoplásicas humanas de carcinoma de mama y gastrointestinal, y de leucemia mieloide crónica. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) estudiar el rol del antígeno Le x en la interacción entre PMN y células tumorales Le x+ con células del endotelio vascular humano; 2) estudiar la citotoxicidad anticuerpo anti-Le x-dependiente mediada por complemento sobre PMN humanos y células MCF-7. En ensayos de adhesión de PMN y células MCF-7 a células de endotelio HUVEC, se estudió el efecto de dos anticuerpos monoclonales (mAb) anti-Le x MCS-1 (IgG3) y FC-2.15 (IgM), y otro mAb anti-sialil-Le x (sLe x). Los porcentajes de adhesión de PMN a HUVEC descendieron significativamente respecto a los controles a $22,7 \pm 17,0$ y $43,0 \pm 9,8$, para los mAb MCS-1 y anti-sLe x, respectivamente. Para MCF-7, la adhesión a HUVEC fue bloqueada significativamente sólo por el mAb MCS-1 ($43,0 \pm 8,5\%$). Respecto a la citotoxicidad FC-2.15-dependiente mediada por complemento, FC-2.15 (20 mg/ml) produjo una significativa citólisis de PMN y MCF-7 marcados con Cr(51) y adheridos

a endotelio HUVEC con porcentajes de lisis de $91,9 \pm 11,4$ y $81,5 \pm 20,4$, respectivamente, en relación a los ensayos control en presencia de IgM. Para PMN y MCF-7 marcados radiactivamente pero no adheridos a HUVEC los porcentajes de lisis fueron de $97,0 \pm 4,2$ y $84,5 \pm 3,8$, respectivamente. Ensayos de citotoxicidad FC-2.15-dependiente sobre PMN no marcados adheridos a HUVEC-Cr(51) demostraron lisis de HUVEC durante el tratamiento ($23,7 \pm 11,8$; $P < 0,01$). Se concluye que: a) el antígeno Le x participa en la adhesión de PMN y células MCF-7 a endotelio HUVEC; b) el anticuerpo anti- Le x FC-2.15 produce similar citotoxicidad anticuerpo-dependiente mediada por complemento de PMN y MCF-7 ya sea adheridos o no a HUVEC; c) HUVECs sufren citólisis significativa durante la citotoxicidad anticuerpo-dependiente de PMN.

1037. (7591) ENSAYO CLINICO DE FASE I DE VACCIMEL Y GM-CSF EN PACIENTES CON MELANOMA ESTADIO IIB, III Y IV. MORDOH, JOSÉ; TSCHURL DE MOTTA, PATRICIA; VON EUW, ERIKA M; BRAVO, ALICIA INÉS; KAPLAN, JULIO; BARRIO, M MARCELA

Centro de Investigaciones Oncológicas CIO-FUCA. Fundación Instituto Leloir, Hospital Eva Perón, San Martín, Bs As.

VACCIMEL es una mezcla de tres líneas celulares de melanoma humano irradiadas. Un Estudio previo de Fase II demostró que VACCIMEL incrementa la sobrevida libre de enfermedad de pacientes (pts) con melanoma estadio III (AJCC) de 7 meses (control, n=24) a 20 meses en el grupo vacunado (n=30), observándose regresiones completas de lesiones metastásicas <5 mm diámetro. Se realizó un Ensayo Clínico de Fase I de VACCIMEL+ GM-CSF (Disp. ANMAT N° 4485/02) para determinar la toxicidad y efectividad de la asociación en pts con melanoma estadios IIB, III y IV (edades: 15-67 años; n=20) se administraron 4 dosis de VACCIMEL i.d. (15 x10(6) cél/vac) c/ 3 semanas, con BCG como adyuvante. Cinco cohortes de 4 pts recibieron placebo, 150µg, 300µg, 400µg ó 600µg de GM-CSF, divididos en 4 inyecciones y administrados i.d. en el sitio de vacunación. Una pt interrumpió el protocolo por progresión temprana de la enfermedad. Las toxicidades más frecuentes fueron: fiebre grado 1(5/19); astenia grado 1(9/19); cefalea grado 1(6/19); dolor torácico grado 1(5/19); mialgia grado 1(9/19); toxicidad local grado 2(19/19). La combinación VACCIMEL + GM-CSF resultó segura ya que no se observó en ningún pt toxicidad de grado 3. La dosis óptima de GM-CSF fue 400µg, ya que 3/4 pts que recibieron 600µg presentaron dolor torácico grado 1, y 2/4 pts dolor abdominal grado 1. La dosis de BCG debió ser reducida en 5/20 pts, toxicidad no relacionada con la dosis de GM-CSF, que no debió ser reducida en ningún pt. La respuesta inmune celular evidenciada por DTH resultó mayor en el grupo que recibió 400 µg de GM-CSF. Los pacientes con dosis mayores de GM-CSF mostraron un incremento de la respuesta humoral contra BCG, pero no contra VACCIMEL, medida por Western Blot (IgG e IgM). No hubo variaciones importantes entre los distintos grupos en el % de linfocitos T supresores (CD4+/CD25+). Concluimos que VACCIMEL + GM-CSF 400 µg es un tratamiento con escasa toxicidad, que incrementa la respuesta inmune celular.

1038. (7764) EFECTO ANTITUMORAL Y MECANISMO DE ACCIÓN DE TERAPIA METRONÓMICA EN MODELOS TUMORALES MURINOS. ROZADOS, VIVIANA R.^{1*}, MAINETTI^{1*}, LEANDRO E.; BONFIL², R. DANIEL; SCHAROVSKY¹, O. GRACIELA

¹Inst Genética Exp, Fac. Cs.Médicas, U.N.R. Rosario.

²WSU School of Med and Karman Cancer Inst, Detroit, MI, USA

La terapia metronómica (TM) es la administración crónica de dosis bajas y no tóxicas de agentes quimioterápicos. Anteriormente, demostramos el efecto antitumoral de TM con Ciclofosfamida (Cy) sobre el sarcoma S-E100 y el linfoma L-TACB, ambos de rata, y sobre el carcinoma mamario de ratón M-234p. En este trabajo se estudió la actividad antitumoral de TM con Doxorubicina (DOX)

en el modelo M-234p y el mecanismo de acción de la terapia en ese modelo y en el de S-E100. Ratones BALB/c inoculados s.c. con M-234p (Día 0) fueron tratados ip desde el día 8 dos veces/semana con 1,0 mg/kg DOX o con Solución Fisiológica (Testigo). Se determinaron el tamaño tumoral y el peso corporal, obteniéndose suero en los días 0 y 20. La concentración del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) sérico fue evaluada por ELISA tanto en el experimento anterior como en otro llevado a cabo previamente con TM con Cy (5 mg/kg, 3 veces/semana) en portadores de S-E100. Para evaluar el efecto de la TM con Cy sobre la angiogénesis in vivo en ratas tratadas con 4 dosis de Cy (10mg/kg), se inyectó sc Matrigel conteniendo factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y se determinó la densidad vascular en el gel. En el modelo M-234p el tratamiento con TM con DOX inhibió significativamente el crecimiento tumoral (al día 21 $p < 0,05$, Test T de Student), y aumentó la sobrevida del grupo tratado. El tratamiento no fue tóxico, por cuanto el peso corporal no difirió entre grupos. La concentración sérica de VEGF, tanto en el modelo de M-234p como en el de SE-100, fue menor en los grupos tratados con TM que en los testigos correspondientes ($p < 0,01$). La densidad vascular en el modelo de Matrigel fue menor en el grupo tratado con TM con Cy que en el control. En conclusión, la TM con DOX posee un efecto antitumoral sin toxicidad en un carcinoma mamario murino. Ello sería el resultado de un efecto antiangiogénico evidenciado tanto con la TM con DOX como con Cy.

1039. (7774) MECANISMOS DE RESISTENCIA AL CISPLATINO (CDDP) MEDIADOS POR GLUTATIÓN (GSH), CISTEAMINA (CSM) Y β-MERCAPTOETANOL (BME). RONCI, NATALIA; OLEA, DANIELA; MIRA, ANABELA; LOPEZ LARRAZA, DANIEL

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)

El GSH puede unirse al CDDP y expulsarlo de la célula, reduciendo los aductos CDDP-ADN. No se sabe si otros tioles de diferente tamaño, carga y nucleofilicidad comparten esta capacidad. Aquí se estudió en qué medida, el agregado de estos tioles previo o posterior al CDDP, afectaba la frecuencia de aductos y la supervivencia celular de células humanas. En células linfoblastoides, la CL50 del CDDP (que produce una mortalidad celular del 50%) fue de $2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ y la D63 (dosis que reduce las amplificaciones de PCR en 63% y produce 1 aducto/cadena) de $70 \pm 10 \mu\text{g/ml}$. El agregado de GSH antes del CDDP, aumentó la supervivencia ($70 \pm 7\%$ a $2 \mu\text{M}$ CDDP) y redujo la frecuencia de los aductos ($0,51 \pm 0,15$ aductos/cadena a $70 \mu\text{g/ml}$). El agregado postratamiento aumentó la supervivencia ($74 \pm 5\%$), pero no modificó el nivel de aductos ($1,1 \pm 0,23$). La CSM y el BME pre y postratamiento aumentaron la supervivencia (alrededor de un 25%) pero no modificaron la frecuencia de aductos. Luego analizamos la supervivencia y la frecuencia de aductos en presencia y ausencia de GSH, en leucocitos de 5 pacientes con cáncer de pulmón que habían respondido a terapias con esta droga (R) y 5 que no (NR). La CL50 y la D63 de R fue de $1,8 \pm 0,4 \mu\text{M}$ y $45 \pm 10 \mu\text{g/ml}$. En los NR fueron $4,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ y $109 \pm 30 \mu\text{g/ml}$. Cuando se eliminó el GSH con sulfoxin butionina, de los leucocitos de NR, la CL50 produjo una mortalidad de $75 \pm 10\%$ y la D63, una frecuencia de $2 \pm 0,25$ aductos. Al agregar GSH a los leucocitos de los R, la CL50 produjo una mortalidad de $30 \pm 5\%$ y la D63, una frecuencia de aductos de $0,56 \pm 0,15$. El GSH y el ADN competirían por el CDDP y sería por ello que el agregado de GSH antes que la droga disminuye la frecuencia de aductos, pero no si se agrega después. Los otros dos tioles no se unen a la droga y por ello no afectarían la frecuencia de aductos. Los tres tioles neutralizan radicales libres y así aumentarían la supervivencia celular. Una concentración de GSH anormal sería un factor determinante de resistencia al CDDP.

1040. (7861) REMISIÓN DEL TUMOR MAMARIO MURINO LM3 POR TRATAMIENTOS FOTODINÁMICOS REPETIDOS CON LA PORFIRINA SINTÉTICA MESO-TETRA (N-TRIMETILANILINA) PORFIRINA (TMAP) INYECTADA

POR VÍA ENDOVENOSA O INTRATUMORAL. COLOMBO, LUCAS LUIS; VANZULLI, SILVIA INES; STOCKERT, JUAN CARLOS

Dpto. Inmunobiología, Area Invest. Inst. Roffo (UBA). IEO, Fund. Maissa, Acad. Nac. Med., Dpto. Biología, Fac. Ciencias, Univ. Autónoma de Madrid, España.

La Terapia Fotodinámica (TFD) en cáncer consiste en la incorporación dentro de las células de un tumor, de drogas que no son tóxicas per se, llamadas Fotosensibilizadores (FS), pero que al iluminarse con una longitud de onda adecuada producen radicales libres que matan a las células iluminadas. 26 ratones BALB/c con tumores intradérmicos de 3 mm de diámetro del tumor (D) mamario murino LM3 se inyectaron con el FS TMAP: (100 µg/ 0.5 ml) endovenoso (iv) (n=16), o (10 µg/ 0,1 ml) intra tumor (it) (n=10). Se irradiaron, bajo anestesia general, a las 24hs (iv) (n=9) o a la hora (it) (n=5) durante 1 h (dosis total: 290 J/cm2) con lámpara de 35 W y reflector dicróico, filtro azul-rojo (long. de onda max: 419, 457 y 650 nm) y filtro anticálórico. La luz se guió por varilla de vidrio (1 cm de diámetro), apoyada con glicerol sobre la piel. El tratamiento se repitió a día 2 (iv) o a días 2, 4 y 6 (it). La TFD iv. dió remisiones parciales con más sobrevida que los controles iv: días: mediana (rango): 72 (59-90) vs 87 (66-111) p=0,011 (Mann-Whitney test), con un menor número total de metástasis pulmonares espontáneas: 33 (19-155) vs 9 (0-48) p=0,016 y de menor tamaño (% de metástasis > 2 mm de diámetro: 5 (2,2-12,12) vs 0 (0-12,5) p=0,020. La TFD it. produjo regresión total (D=0 mm) en 4/5 tumores durante 18,5 (18-37) días (mediana (rango)), mientras que al día 18 los controles it tuvieron un D=4,58 mm (D inicial=2,75). En 1/5 animales hubo curación (no tumor >300 días). Cuando todos los controles ya habían muerto, ninguno tratado lo había hecho. La TFD it mostró una cantidad algo menor de metástasis (no significativa) respecto a sus controles. La histopatología a las 24 h de una única TFD it mostró necrosis hemorrágica y picnosis nuclear. Estos resultados indican que TMAP en inyección it y repetida más las otras modificaciones realizadas (varilla de vidrio y glicerol) mejoran las posibilidades de éxito de la TFD.

1041. (7916) POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR (PAF), RELACIÓN FENO-GENOTÍPICA (FG) EN PACIENTES CON MUTACIONES NOVELES EN EL GEN APC. SOLANO, ANGELA R.; DOURISBOURE, RICARDO; GRAZIANO, ALFREDO; GUTIERREZ, ALEJANDRO; COLLIA AVILA, KARINA; PODESTA, ERNESTO J

Depto de Bioquímica. F. Medicina. UBA. S. de Coloproctología, Hospital B. Udaondo, I. Alexander Fleming

La PAF es una enfermedad autosómica dominante que se presenta con cientos a miles de polipos en la segunda década de vida, presentado mutaciones (M) en el gen APC. Nosotros describimos previamente el hallazgo de 14 M noveles en el gen APC en el estudio de 71 familias. El estudio del gen APC proporciona la herramienta necesaria para detectar portadores de la mutación en los familiares del caso índice (CI) para realizar la prevención indicada. Se ha postulado que de acuerdo a la zona de la M dentro del gen se puede realizar FG que ayudaría a las conductas a tomar en los portadores sanos. El objetivo de este trabajo fue estudiar a los familiares de CI, incluyendo las M noveles con el objeto de realizar FG. Se han estudiado 68 familiares de los diferentes CI encontrándose 35 portadores y 34 negativos. Dentro de los portadores en tres de ellos había una marcada diferencia en las manifestaciones extracolónicas de acuerdo a la zona de la M y las halladas en CI,: A) Se detectó en un niño de dos años un hepatoblastoma, no correspondiendo a la zona de M con esta manifestación extracolónica; B) Se ha encontrado una portadora de 15 años de edad con manifestaciones extracolónicas en colon duodeno y estomago, no correspondiendo a la zona de M y diferente a lo observado en el CI; C) Pacientes de tres familias no presentaron hiperplasia congénita del epitelio pigmentario de la retina como se observó en los respectivos CI. Estos estudios indican que en las generaciones posteriores

a CI a pesar de tener la misma mutación la relación FG esta alterada indicando la necesidad de este tipo de estudios para la utilización correcta de FG en la prevención y terapia a aplicar en portadores de mutaciones en generaciones posteriores a la del caso índice.

REPRODUCCIÓN 5

1042. (7029) GLICOPROTEÍNA DE UNIÓN A ESPERMATOZOIDES SBG EN OVIDUCTO DE PORCINO. PÉREZ, FERNANDO ADRIÁN¹; ROMA, STELLA MARIS²; CABADA, MARCELO O²; MARINI, PATRICIA²

Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. UNR. Div. Biología del Desarrollo, IBR-CONICET, Área Biología, Fac. Cs. Bioq. y Farmacéuticas. UNR.

En muchos mamíferos, la mayor parte de los espermatozoides que ingresan al oviducto se unen a las células epiteliales tubarias del istmo, constituyendo un depósito de gonias vitales y fértiles para ser liberadas en la fase peri-ovulatoria. Las bases moleculares de la interacción espermatozoide-célula oviductal no se han establecido, aunque existen evidencias que las espermadhesinas asociadas a los espermatozoides reconocen oligosacáridos presentes en las células epiteliales. En nuestro laboratorio, se aisló una glicoproteína de oviducto de *Sus scrofa* (cerdo) denominada SBG (Sperm Binding Glycoprotein) cuyas características indican que podría intervenir en la adhesión, aunque aún no se ha determinado su ubicación celular. El objetivo del trabajo fue localizar la proteína SBG en los segmentos proximal y distal de oviducto de cerdas hembras. Para ello se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas empleando anticuerpos policlonales anti-SBG. Además, se realizó un análisis semicuantitativo del contenido de SBG en ambos segmentos, mediante slot-blot y posterior densitometría. Los resultados evidenciaron que la cantidad de SBG en extractos proteicos de ampulla fue menor que en istmo, siendo el contenido en la ampolla de aproximadamente 2/3 del presente en istmo. El estudio histológico exhibió positividad en los dos tercios superficiales de las criptas del istmo, resultando negativo el fondo de las mismas. Los anticuerpos anti-SBG marcaron intensamente el sector apical celular. En la ampolla la positividad fue menor, reaccionando preferentemente aquellas células ubicadas adyacentes a la luz del oviducto. Los estudios histológicos son congruentes con los semicuantitativos, indicando alta concentración de la proteína SBG en el istmo. La presencia de dicha proteína en el sector considerado un reservorio funcional pre-ovulatorio y su ubicación apical en la célula oviductal, en contacto con el contenido luminal, indicarían una probable participación de la proteína SBG en el almacenamiento de espermatozoides.

1043. (7139) CRECIMIENTO DEL TESTÍCULO HUMANO NEONATAL: LOS ESTRÓGENOS SERIAN POSIBLES FACTORES INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS. BERENSZTEIN, ESPERANZA; SARACO, NORA; SCIARA, MARIELA; RIVAROLA, MARCO; BELGOROSKY, ALICIA

Hospital Garrahan. Buenos Aires

Hemos descrito un vigoroso crecimiento del testículo humano (TH) neonatal con disminución de la apoptosis previo a la activación funcional postnatal. Los estrógenos modulan la proliferación y la apoptosis, actuando a través de receptores de estrógenos (ER) α y β . Con el objeto de estudiar si los estrógenos estarían involucrados en la modulación de la apoptosis en el TH prepuber (PP) se evaluó la inmunolocalización de ER α y β y de aromatasa (ARO) en función de la edad. THPP se dividieron en tres grupos (G): G1 neonatos (1-21 días), G2 activación postnatal (1-7 meses) y G3 niñez temprana (12-36 meses). La ARO se localizó principalmente en células intersticiales (CI) y germinales (G) en G1yG2, y escasamente en C de Sertoli (S); el ER β en todos los tipos celulares, siendo la expresión mayor en CI de G1. El ER α fue <5%. Valores expresados como % de células posi-

vas (C+). ¹p<0.05 vs G1yG2; ²p<0.05 vs G2yG3; ³p<0.05 vs G1yG2; ⁰p<0.05 vs G1yG2.

% C +	n	CICS	CG	
ARO G1	10	36.8 ± 4.4	3.6 ± 3.7	31.1 ± 7.6
ARO G2	6	40.7 ± 2.7	8.1 ± 7.1	27.1 ± 7.5
ARO G3	7	17.7 ± 11.2 ¹	13.1 ± 4.2	7.3 ± 7.7 ³
ERβ G1	10	26.2 ± 4.4 ²	24.5 ± 5.0	44.7 ± 3.0
ERβ G2	6	12.3 ± 1.6	25.9 ± 5.9	42.2 ± 2.6
ERβ G3	7	13.7 ± 0.5	28.1 ± 1.5	57.3 ± 1.1 ⁰

Los estrógenos sintetizados a partir de la testosterona en CI y CG, actuarían vía ERβ en CI de G1 y en CS y CG en los 3 G. El receptor (Rc) de IGFs fue localizado en CI con mayor expresión en TH neonatal. Proponemos que la elevada expresión simultánea de IGFRC, ARO y ERβ podría modular el crecimiento testicular en el primer mes de vida.

1044. (7265) CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LA ASOCIACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE ROEDOR DURANTE LA MADURACIÓN EPIDIDIMARIA. MONCLUS, M.A. (1); CABRILLANA, M.E. (1); BOARELLI, P.V. (1); CESARI, A. (2); VINCENTI, A.E. (1); FORNÉS, M.W. (1)

I.H.E.M. Fac. Cs. Médicas - U.N. de Cuyo (1) - I.I.B. U.N. de Mar del Plata

Durante la maduración epididimaria, los espermatozoides (es) de Rata y Ratón se asocian transitoriamente entre sí formando estructuras denominadas «Rosetas». Estas constan de decenas de (es) unidos entre sí por sus cabezas y con sus colas libres hacia fuera. El fenómeno se produce a medida que los (es) inicialmente libres, progresan en su pasaje por el epidídimo, ya que sólo observamos Rosetas a partir del cuerpo distal y cola. Esta regionalización del fenómeno sugiere la influencia de factores «locales» que promueven la asociación reversible de los (es). Si realizamos una punción de la cola epididimaria y obtenemos una gota del contenido sobre medio de cultivo adecuado a 37 °C los (es) gracias a su propia motilidad comienzan a desprenderse hasta disociar completamente la estructura. Analizamos morfológicamente las Rosetas en el Ratón mediante diversas técnicas de microscopía (Óptica, Video, TEM, SEM, Inmunocitoquímica) observando que las cabezas se mantienen unidas por un material electrodensito, PAS (+) y reconocido por lectinas que marcan alfa D-Glucosa/Manosa. Iniciamos la caracterización del factor/res glicoproteico involucrado en Fluido Epididimario de Rata. Para ello perfundimos la cola del epidídimo con PBS y separamos el fluido obtenido por Cromatografía de Filtración (Sephacryl S200) obteniendo 4 fracciones de diferentes pesos moleculares. Probamos la capacidad de reproducir el fenómeno in vitro incubando (es) de Rata móviles y aislados por medio de Swim Up con cada una de las fracciones obtenidas. Mediante Cromatografía de Afinidad (Concanavalina A- Sepharosa 4B) continuaremos la purificación de la o las moléculas involucradas. En Ratón caracterizamos morfológicamente las Rosetas y determinamos su lugar de formación en las zonas más distales del epidídimo. De las fracciones proteicas aisladas del fluido epididimario de Rata, las 2 de mayor peso molecular lograron reasociar los (es) en Rosetas.

1045. (7283) EFECTO DE LA ADICIÓN DE HEPARINA EN EL MEDIO DE CAPACITACIÓN SOBRE LA FISIOLÓGIA ESPERMÁTICA EN CERDOS. DAPINO, DORA (1); MARINI, PATRICIA (2); CABADA, MARCELO (2)

Cátedra de Fisiología, Fac. de Cs. Veterinarias, UNR. División Biología del Desarrollo, IBR - CONICET, Área Biología, Fac. de Cs. Bioqu. y Farm., UNR

La heparina ha sido utilizada para el estudio in vitro de la acción endógena de los glucosaminoglucanos sulfatados del oviducto femenino, mostrando efecto capacitante en espermatozoides de bovinos, humanos y equinos. Con el fin de determinar la acción de la misma sobre los espermatozoides porcinos, se obtuvo semen de 8 animales adultos, que se

centrifugó a 700 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, resuspendiendo el pellet en TALP hasta una concentración de 10 (7) espermatozoides/ml. Se incubaron 3 alícuotas con concentraciones de 0, 10 y 100 µg/ml de heparina (C0, C10 y C100) a 39 °C. La capacitación y la vitalidad espermática fueron evaluadas con la tinción fluorescente Clortetraciclina y con eosina/nigrosina, respectivamente a los 0, 90 y 180 minutos de incubación (T0, T90, T180). Finalmente, se contaron 3200 células (8 réplicas, 2 extendidos/muestra y 200 células/extendido). El porcentaje de espermatozoides capacitados fue T0: 5,8 ± 1,8; 4,6 ± 1,8; 5,3 ± 2,5; T90: 27,7 ± 4,1; 40,6 ± 4,7; 44,0 ± 7,4 y T180: 33,5 ± 5,8; 43,5 ± 3,2; 44,3 ± 6,8: En todos los casos, para C0, C10 y C100, respectivamente. Se determinó por ANOVA, que los valores de capacitación con heparina en T90 y T180, no difieren significativamente (p>0.01) y sí se observan diferencias significativas con respecto a C0 (p<0.01). La vitalidad al final del experimento fue de alrededor del 70 % en todas las muestras; excepto en C100 en donde fue de un 40 %. Se concluye que la heparina aumenta el número de espermatozoides capacitados in vitro, con valores óptimos a los 90 minutos de incubación y en concentraciones de 10µg/ml. Debido a que existen evidencias de un incremento de glucosaminoglucanos sulfatados del tipo heparina en el oviducto de la cerda durante el estro, estos resultados podrían indicar que estos compuestos cumplen un rol importante en el proceso de fecundación en esta especie.

1046. (7347) ESTRÉS OXIDATIVO Y ACTIVIDAD DE CREATINA QUINASA EN LA CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE BOVINO CRIOPRESERVADO. CÓRDOBA, MARIANA; PINTOS, LAURA; BECONI, MARTHA

Química Biológica. Fac. Cs. Veterinarias. UBA

La heparina (H), un glucosaminoglucano y la quercitina (Q), un inhibidor de la ATPasa dependiente de calcio presente en la membrana, capacitan al espermatozoide bovino. La creatina quinasa (CK-B) de la lanzadera de fosfato de creatina cataliza reacciones de fosforilación a nivel de sustrato. Difenileneiodonio (DPI) (2µM) es un inhibidor de una NADPH-oxidasa de membrana plasmática. El objetivo fue determinar en espermatozoide criopreservado, la variación del estrés oxidativo (EO) y su vinculación con la actividad de CK-B y la participación de la NADPH-oxidasa de membrana sensible a DPI en el proceso de capacitación inducido por H (60 µg/ml) o Q (50µM). La actividad enzimática de CK-B se determinó por un método cinético, utilizando fosfato de creatina como sustrato y el EO por espectrofluorometría con diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCHFDA). La capacitación y la viabilidad fueron evaluadas por la técnica de epifluorescencia de clortetraciclina (CTC) y de Azul Tripán, respectivamente. Análisis estadístico: ANOVA y Test de Tuckey (post-anova) (p<0.05). El porcentaje de espermatozoides capacitados con H o Q aumentó significativamente respecto al control; no se observaron diferencias en la viabilidad espermática debidas al tratamiento. La H y la Q mantienen el nivel de EO del control (251.20 ± 104.55/10(8) esp/ml) (p>0.05). La actividad de CK-B disminuye durante la capacitación con H (59.32 ± 9.38 U/10(8) esp x 10(-2)) o Q (46.44 ± 10.28 U/10(8) esp x 10(-2)) respecto al control (99.81 ± 8.34 U/10(8) esp x 10(-2))(p<0.05). La inhibición de la NADPH-oxidasa de membrana plasmática provoca un incremento de EO y una variación diferencial de CK-B (H/DPI: 43.42 ± 6.07 U/10(8) esp x 10(-2) y Q/DPI: 76.91 ± 10.39 U/10(8) esp x 10(-2))(p<0.05) asociada a una inhibición significativa del proceso de capacitación (p<0.05). El estrés oxidativo y/o señales intracelulares generadas por heparina o quercitina actuarían modulando la actividad de la creatina quinasa en el espermatozoide bovino criopreservado.

1047. (7450) LA SALIDA DE COLESTEROL DEL PLASMALEMA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS PROMUEVE LA ASOCIACIÓN DE RAB3A Y LA EXOCITOSIS ACROSOMAL. BELMONTE, SILVIA; LÓPEZ, CECILIA; ROGGERO, CARLOS; DE BLAS, GERARDO; TOMES, CLAUDIA; MAYORGA, LUIS

IHEM-CONICET, Facultad Cs. Médicas, U.N. de Cuyo, Mendoza.

La reacción acrosomal (RA) implica la exocitosis del acrosoma regulada por calcio. Las gametas recién eyaculadas no pueden sufrir RA y necesitan un tiempo de capacitación en el tracto genital femenino o en un medio in vitro. La remoción de colesterol de las membranas es una modificación que sufre la gameta durante la capacitación, sin embargo no se conoce cómo esta pérdida afecta el proceso de fusión de membranas durante la RA. En este trabajo, permeabilizando espermatozoides con Estreptolisina O, logramos disociar los cambios que ocurren durante la capacitación de aquellos que suceden durante la exocitosis y demostramos que la salida de colesterol afecta directamente el proceso de fusión. Observamos que la incubación durante 15 min. de gametas capacitadas intactas y permeabilizadas con metil- β -ciclodextrina (CD) 1mM (extrae colesterol) aumenta significativamente el porcentaje de células reaccionadas. Contrariamente, CD precargada con colesterol inhibe la RA. Anfotericina B, un antibiótico poliénico que se une a esteroides, inhibe la RA en forma dosis dependiente y su efecto se revierte con colesterol, indicando que este es necesario en una concentración óptima para que ocurra la RA. Usando un quelante de calcio fotoinhibible, demostramos que la salida de colesterol es un proceso temprano en el camino exocítico. Experimentos funcionales comprobaron que la pérdida de colesterol no afecta la activación de Rab3A, evento temprano de la fusión, pero promueve su anclaje a las membranas. El análisis de las membranas por Western Blot demuestra que la depleción de colesterol incrementa la cantidad de Rab3A asociada a las mismas, resultado que se confirmó por inmunomicroscopía electrónica. Los resultados presentados nos permiten concluir que la salida de colesterol promueve el reclutamiento de Rab3A a la membrana plasmática de la gameta. Esta localización es fundamental para inducir el acercamiento de las membranas relevantes en la fusión.

1048. (7876) PKC REGULA LA FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS C2A Y C2B DE SYNAPTOTAGMINA VI EN LA EXOCITOSIS ACROSOMAL. ROGGERO, M*¹; TOMES, C*²; DE BLAS, G*³; CASTILLO, J*⁴; MICHAUT, M*⁵; FUKUDA, M#⁶; MAYORGA, L*⁷

*LBCM, IHEM-CONICET, Fac. de Medicina, U.N.Cuyo Mendoza. *LBCM, IHEM-CONICET, Fac. de Medicina, U.N.Cuyo Mendoza. #RIKEN, Saitama, Japan.*

El acrosoma es un granulo limitado por membranas presente en el espermatozoide. En respuesta a un estímulo sufre un tipo especial de exocitosis dependiente de calcio denominada reacción acrosomal (RA) indispensable para la fertilización. Las synaptotagminas (syt) constituyen una gran familia de proteínas transmembranas que poseen dos dominios citosólicos de unión a calcio y fosfolípidos (C2A y C2B); a estas proteínas se les atribuye la función de sensores de calcio involucrados en la exocitosis. Previamente mostramos que syt VI está presente en espermatozoides humanos. También observamos que el dominio citosólico (C2A+C2B) purificado de syt VI inhibe la RA en espermatozoides humanos permeabilizados y este efecto es regulado por fosforilación. En este trabajo estudiamos el efecto individual de C2A y C2B determinando que ambos pueden interferir con la RA. El efecto inhibitorio de estos dominios purificados fue completamente anulado por fosforilación con PKC β II. Las Thr418 y Thr419 conforman un sitio probable de fosforilación por PKC en la región polibásica del dominio C2B (KKKTTIK), una región clave para la función de las syt. Estos residuos fueron mutados a Ala (TA) para eliminar el sitio probable de fosforilación o a Glu (TE) para imitar la carga negativa introducida por fosforilación. La mutante TA fue inhibitoria y su efecto no fue regulado por fosforilación, mientras que TE no inhibió. Resultados similares se obtuvieron cuando la Thr284 en la región polibásica del dominio C2A (KCKLQTR) fue mutada a Ala o Glu. Es importante destacar que estos residuos Thr están conservados en todas las syt identificadas al presente, sugiriendo que su fosforilación sería un evento clave en la regulación de la proteína. Nuestros resultados indican que existen dos sitios claves de fosforilación por PKC en syt VI que regulan su

fuertemente su función durante la reacción acrosomal en espermatozoides humanos.

1049. (7935) DIFERENCIAS INDUCIDAS POR CAMBIOS EN EL FOTOPERÍODO EN LA FISIOLÓGIA DE LA GLÁNDULA CLOACAL Y EL PESO TESTICULAR DE CODORNICES SELECCIONADAS POR UNA RESPUESTA ADRENOCORTICAL DIVERGENTE. MARIN, RAUL H.¹; SATTERLEE, DANIEL G.²

¹CONICET - Cát. Química Biológica, FCEFYN, UNC, Argentina; ²AABL, Dpt. Anim. Sci., LSU, LA, USA

En codornices, la activación adrenal ha sido relacionada a una depresión gonadal en machos. En este trabajo, manipulaciones en el fotoperíodo que inducen un crecimiento (días largos, 14:10 hs luz:osc.) y una involución (días cortos, 6:18 hs luz:osc.) gonadal fueron usados para examinar cambios en la fisiología de la glándula cloacal en líneas de codornices machos seleccionadas por una liberación de corticosterona plasmática reducida (bajo estrés) o exagerada (alto estrés) en respuesta a un estresor agudo. Diferencias en las líneas en tamaño (área y volumen) de la glándula y en el N° de individuos que producen espuma cloacal e intensidad de dicha producción fueron determinadas inicialmente en machos adultos mantenidos en días largos y luego semanalmente durante la subsecuente exposición a días cortos durante 3 semanas y su retorno a días largos por otras 3 semanas. Diferencias en el peso testicular relativo fueron medidas al término del estudio. Inicialmente, el tamaño de la glándula fue marcadamente mayor (P<0,05) en los machos de bajo estrés. La glándula se redujo en ambas líneas cuando fueron expuestas a días cortos aunque las diferencias a favor de la línea de bajo estrés se mantuvieron durante las dos primeras semanas (P<0,05). Las diferencias entre las aves se perdieron en la última semana de días cortos y la primera semana de retorno a los días largos. Interesantemente, al final de la segunda semana de días largos y posteriormente, una marcada diferencia (P<0,05) en el tamaño glándular a favor de las aves de bajo estrés fue nuevamente observada. La producción de espuma cloacal mostró un patrón similar al del tamaño de la glándula. Al finalizar el estudio, el peso testicular de los machos de bajo estrés fue mayor (P<0,05) que el de los de alto estrés. En codornices, la selección por una respuesta adrenocortical reducida ha resultado en ciertas ventajas reproductivas en machos sometidos a fotocastración y subsecuente re-fotoestimulación.

1050. (8004) VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE CALBINDINA D28K EN TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATONES HÍBRIDOS SUBFÉRTILES, RATONES CD1 Y RATONES SALVAJES MILAN II. DÍAZ DE BARBOZA, GABRIELA (1); PONCE, RUBÉN (2); ESPOSITO, ANTONIO (3); GARAGNA, SILVIA (3); TOLOSA DE TALAMONI, NORI (1)

Lab. «Dr. Cañas» Fac. Cs. Médicas, UNC. (2) Fac. Odontología, UNC y (3) Università degli Studi di Pavia, Italia.

Las especies de ratones CD1, Milan II y el híbrido subfértil procedente de hembras CD1 y machos Milan II presentan variaciones en el número diploide de cromosomas, afectándose en el animal híbrido el proceso de espermatogénesis. Dado que los rearrreglos Robertsonianos afectan la morfología y sobrevivencia de las células germinales, el propósito de este estudio fue evaluar si la expresión de calbindina (CB), molécula que amortigua calcio, se modifica en células de la espermatogénesis debido a posibles alteraciones en la concentración intracelular de calcio iónico. Para ello se usaron ratones machos de laboratorio CD1 (2n = 40), salvajes Milan II (2n = 24) e híbridos (2n = 32). Los testículos de ratones de 3 meses de edad fueron removidos y fijados. Secciones transversales de los túbulos seminíferos se colorearon con hematoxilina-PAS o se procesaron por la técnica de inmunoperoxidasa, empleando un anticuerpo policlonal anti-CB. Los resultados mostraron expresión de CB en escasas células espermáticas redondas del estadio IX de ratones CD1. En los ratones salvajes Milan II, CB se expresó sólo en escasas células espermáticas

redondas del estadio I. En animales híbridos, CB se encontró en un elevado número de espermatoцитos del estadio XII, mientras que la inmunotinción de CB fue negativa en células del mismo estadio en testículos de ratones CD1 y Milan II. En todas las especies de ratones el citoplasma y núcleo de las células de Leydig presentaron inmunorreactividad positiva para CB. Los resultados sugieren que, en los animales híbridos la mayor expresión de CB estaría destinada a amortiguar la elevación de calcio producida en el proceso de muerte celular del ciclo espermático.

1051. (8018) ISOFORMAS DE CADERINA E Y SU INMUNOLocalIZACIÓN EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO. LENTZ, EZEQUIEL; MARÍN-BRIGGILER, CLARA; VEIGA, FLORENCIA; VAZQUEZ-LEVIN, MÓNICA

IBYME, CONICET-UBA

La caderina E (cad-E) es una molécula de adhesión célula-célula de 120 KDa que presenta cinco dominios caderina extracelulares, uno transmembrana y uno citoplasmático. Estudios de nuestro grupo describieron su presencia en el espermatozoide y sugieren su participación en la interacción de gametas. Ensayos con un anticuerpo dirigido contra el dominio caderina 5 revelaron la presencia de 4 isoformas espermáticas de cad-E de 122, 105, 97 y 86 KDa (Lentz et al, 2004). El objetivo del estudio fue iniciar la caracterización bioquímica de las isoformas de cad-E y determinar su distribución en el espermatozoide. Se realizaron ensayos de extracción, tratamientos enzimáticos, «Western immunoblotting» e inmunocitoquímica con tres anticuerpos anti cad-E. Utilizando un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular caderina 2 de cad-E se detectaron las formas espermáticas de 122, 97 y 86 KDa, mientras que un anticuerpo contra un epítipo del dominio intracelular detectó las de 122 y 105 KDa. Estos resultados sugieren que cad-E105 está truncada en el extremo N-terminal y cad-E97 y cad-E86 lo están en el C-terminal. Cad-E86 fue extraída del espermatozoide en un buffer con NaCl 1 M y fue inmunodetectada en fluido de cauda epididimario y plasma seminal; su señal se encontró disminuida en espermatozoides capacitados. El tratamiento de espermatozoides con la enzima PLC-PI resultó en la remoción de cad-E86 y cad-E97, sugiriendo que cad-E97 está anclada a membrana vía Glicosil Fosfatidil Inositol (GPI). Ensayos de inmunocitoquímica con los anticuerpos dirigidos contra la región extracelular de cad-E mostraron su presencia en la cabeza y flagelo espermáticos. Los estudios con el anticuerpo contra el epítipo intracelular revelaron una señal solo en la cola del espermatozoide, indicando cad-E122 y 105 estarían localizadas en el flagelo mientras que cad-E97 y cad-E86 en cabeza y flagelo. En conclusión, se identificaron cuatro isoformas de cad-E en el espermatozoide humano que tendrían una localización celular diferencial.

1052. (8045) EXPRESIÓN DE CADERINA E EN ESPERMATOZOIDES DE RATÓN. VEIGA, FLORENCIA; LENTZ, EZEQUIEL; RIVERO, CINTIA; VINCENTI, AMANDA; FORNES, MIGUEL; VAZQUEZ-LEVIN, MÓNICA

IBYME, CONICET-UBA. IHEM

Durante el tránsito por el epidídimo, el espermatozoide adquiere la capacidad de interactuar con el ovocito; el epidídimo aporta los factores que le confieren dicha capacidad. La caderina epitelial (cad-E) es una molécula de adhesión celular cuya expresión en el epidídimo ha sido descrita en rata y humano. Estudios recientes de nuestro grupo sugieren la participación de la cad-E en la interacción de gametas de ratón. El objetivo del estudio fue determinar la expresión de cad-E en epidídimo de ratón y evaluar su localización en espermatozoides epididimarios y testiculares. Se realizaron ensayos de «Western immunoblotting» y RT-PCR de epidídimo, e inmunocitoquímica de espermatozoides de caput, corpus y cauda epididimarios y testiculares. Además, se hicieron estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET) de espermatozoides del cauda. La inmunodetección de cad-E se hizo con un anticuerpo policlonal específico dirigido contra el dominio extracelular caderina 5 (San-

ta Cruz Biotech). En Western immunoblotting de proteínas epididimarias se identificó una forma de cad-E de 127 KDa, detectada también en extractos de espermatozoides del cauda. Ensayos de RT-PCR confirmaron la presencia de transcritos de cad-E epididimarios. En inmunocitoquímica, la mayoría de los espermatozoides testiculares presentaron una señal para cad-E tenue en toda la célula. Contrastando, los espermatozoides del caput, corpus y cauda epididimarios presentaron una señal fuerte en la región acrosomal y postacrosomal en un porcentaje variado de células (caput=2-78%, corpus=50-84%, cauda=5-58%; n=3). Los estudios de MET permitieron localizar cad-E en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide. Los estudios confirman la expresión de caderina E en epidídimo de ratón y muestran variaciones en el porcentaje y localización de la proteína en los espermatozoides del ducto. Los estudios de MET revelan la localización de caderina E en la membrana plasmática del espermatozoide.

REPRODUCCIÓN 6

1053. (6913) PARTICIPACION DE PROTEINAS QUINASAS EN LA REACCION ACROSOMAL INDUCIDA POR OXIDO NITRICO EN ESPERMATOZOIDES BOVINOS CRIOPRESERVADOS. RODRIGUEZ, PABLO; BEORLEGUI, NORMA; O'FLAHERTY, CRISTIAN; BECONI, MARTHA

Facultad de Ciencias Veterinarias. Area de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, U.B.A.

Los espermatozoides bovinos requieren de un proceso de preparación denominado capacitación para ser capaces de fertilizar ovocitos maduros, que culmina en un evento exocitótico conocido como reacción acrosomal (RA). El óxido nítrico (NO) se halla involucrado en diversas funciones reproductivas. El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de la proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC) y proteína tirosina quinasa (PTK) en la RA inducida por óxido nítrico en espermatozoides bovinos criopreservados. Los espermatozoides, previamente capacitados fueron incubados durante 15 minutos con concentraciones entre 0,05 y 200 μM de SNP (donante de NO) para evaluar el efecto del NO sobre la RA. Para estudiar la participación de PKA, PKC y PTK se utilizaron inhibidores específicos de estas enzimas: H-89 50 μM , bisindolilmaleimida I (BM) 0,1 nM, genisteína 3 μM , respectivamente. La motilidad progresiva y los porcentajes de RA fueron determinados por microscopía óptica y por la técnica de fluorescencia con clorotetraciclina (CTC), respectivamente. Los resultados se presentan como promedio \pm DS y un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. A partir de 0,1 μM de SNP se observó un incremento significativo del porcentaje de RA, alcanzando niveles máximos entre 5 y 200 μM (24,8 \pm 1,8), sin modificar la motilidad progresiva ni afectar la viabilidad espermática. La participación del NO como inductor de la RA se confirmó usando scavengers específicos (hemoglobina y azul de metileno). Cuando se utilizaron los inhibidores de PKA, PKC y PTK el porcentaje de reacción acrosomal disminuyó significativamente (9 \pm 0,71; 16,75 \pm 0,71; 10,5; respectivamente). Estos resultados confirman la participación de PKA, PKC y PTK como parte de los mecanismos intracelulares que conducen a la reacción acrosomal inducida por NO en espermatozoides bovinos criopreservados.

1054. (6971) CARACTERIZACIÓN DE LIPID RAFTS EN ESPERMATOZOIDES. MIRANDA, PATRICIA (1,3); SLEIGHT, SUSAN (2); ALLAIRE, ALICIA (3); VISCONTI, PABLO (3)

(1) IBYME-CONICET, (2) University of Virginia, (3) University of Massachusetts

Los rafts son subdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos, lo cual les confiere baja densidad e insolubilidad en Tritón en frío, características utilizadas para su aislamiento.

Los rafts se desorganizan al disminuir su contenido de colesterol y este es uno de los mecanismos que le permiten modular la actividad de las proteínas de transducción particularmente abundantes en estas estructuras. Dado que la pérdida de colesterol es un requerimiento indispensable para que los espermatozoides de mamífero adquieran capacidad fertilizante, los rafts podrían estar relacionados con la funcionalidad espermática. En este trabajo analizamos la existencia de rafts en espermatozoides y estudiamos su composición y localización. Espermatozoides epididimarios de ratón fueron inmovilizados en portaobjetos, o extraídos con 0,5% Tritón X100 a 4°C y centrifugados en un gradiente de sacarosa. Extractos totales de espermatozoides (1% SDS) y las distintas fracciones del gradiente fueron analizadas por electroforesis seguida de tinción con plata y secuenciación o transferencia e immunoblot con diversos anticuerpos. Se comprobó la existencia de una subpoblación de proteínas en las fracciones livianas del gradiente de sacarosa. Se verificó la presencia de proteínas marcadoras de rafts (Caveolina 1 y 2, Flotilina 1 y 2) en extractos totales de espermatozoides y en las fracciones livianas del gradiente. Proteínas específicas de testículo y/o espermatozoide (PH20-hialuronidasa, TES101) y otras proteínas ubicuas (Basigina, Transportador de Glucosa 3, Hexoquinasa) se encontraron asociadas a los rafts de espermatozoides. Al analizar la localización celular de estas proteínas por inmunofluorescencia, se observó marcación en el acrosoma (Caveolina 1 y 2, Flotilina 2, PH20), región post-acrosomal (Flotilina 2), pieza intermedia (Basigina, Flotilina 2) y pieza principal (Glut3). Estos resultados permiten concluir que los espermatozoides poseen estructuras tipo rafts que están presentes en los distintos dominios de su membrana.

1055. (7006) 17-B-ESTRADIOL Y A-TOCOFEROL PROTEGEN LA MEMBRANA ESPERMÁTICA DURANTE LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN PORCINO. BREININGER, ELIZABETH¹; BECONI, MARTHA¹; PELÁEZ, JESUS²; DOMINGUEZ, JUAN²; BEORLEGUI, NORMA¹

Facultad de Cs. Veterinarias. 1. Química Biológica. Fac. Cs. Veterinarias U.B.A. 2. Reproducción y Obstetricia. FCV Univ. de León.

En el espermatozoide porcino, el alto grado de insaturación presente en los lípidos de membrana aumenta la probabilidad que ocurra daño oxidativo durante la criopreservación. Los estrógenos y el a-tocoferol funcionan como antioxidantes biológicos evitando la propagación de la lipoperoxidación. El objetivo de este trabajo fue mejorar la calidad espermática del semen porcino criopreservado mediante el agregado de antioxidantes naturales en el diluyente de congelamiento. El semen fue congelado en pastillas con y sin el agregado de diferentes concentraciones de a-tocoferol (0,2-1,0 mg/ml) o de 17-b-estradiol (0,2-1,0 µM) en el diluyente Beltsville F5. Las pastillas se descongelaron en buffer BTS, se lavaron y se incubaron con el mismo buffer durante cuatro horas. Se tomaron muestras a cada hora para determinar parámetros morfológicos, dinámicos y el nivel de lipoperoxidación. El a-tocoferol y el 17-b-estradiol, a todas las concentraciones utilizadas, mejoraron la motilidad post-descongelamiento respecto del control. Ese incremento se mantuvo durante las 2 primeras horas de incubación con todas las concentraciones de a-tocoferol y sólo con 0,5 y 1,0 µM de 17-b-estradiol. El a-tocoferol entre 0,2-1,0 mg/ml disminuyó la lipoperoxidación post-descongelamiento ($p < 0,05$), sin embargo con la concentración de 1,0 mg/ml se observó un efecto pro-oxidante a partir de las 2 horas de incubación. El 17-b-estradiol entre 0,2-1,0 µM disminuyó los niveles de lipoperoxidación respecto del control durante las 4 horas de incubación ($p < 0,05$). No se modificaron los parámetros de viabilidad y de integridad acrosomal respecto del control por el agregado de los antioxidantes utilizados ($p > 0,05$). La capacidad antioxidante del a-tocoferol y el 17-b-estradiol protege la membrana espermática de la lipoperoxidación, mejorando la calidad del semen porcino criopreservado.

1056. (7015) CARACTERIZACION DE MICRODOMINIOS DE MEMBRANA (RAFT) DURANTE LA CAPACITACION Y

FERTILIZACION. BOARELLI, P; MONCLUS, M; VINCENTI, A; FORNES, M

IHEM «Dr. Mario H. Burgos» - Fac. Cs. Médicas - UNCUYO

Los microdominios (MD) lipídicos de la membrana plasmática se asocian con diversas funciones. Una de ellas es la transducción de señales (TdS). La capacitación de la gameta masculina involucra un mecanismo original de TdS donde el colesterol (C) de la membrana cumple un rol importante. Nuestro estudio está orientado a la caracterización y relación de los MD con las funciones específicas en este tipo de células. El C se asocia a glicolípidos y proteínas constituyendo un MD. Uno de nuestros objetivos es co-localizar los componentes lipídicos de los MD: colesterol y esfingolípidos (GM1); mediante marcación específica con el filipinIII (FIII) y subunidad β-toxina colérica (TC) respectivamente. Se sacrificaron ratones adultos (cepa Balb cd). Los E de cola de epidídimo fueron incubados en medio de capacitación -albúmina y bicarbonato- 60' (experimental) y en PBS 10' (control sin capacitar) a 37° y 5% de CO₂. Luego los E fueron fijados y tratados con FIII (30') y TC (15'). Las muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia. Para analizar el rol de los MD en la fertilización se realizaron estudios de inhibición incubando los E con los marcadores específicos (FIII y TC); y posteriormente ensayos de fertilización (FIV). En los E no capacitados, el FIII se localiza en la zona acrosomal excepto en E capacitados, donde solo se observa marca en la gota citoplásmica. La TC, en los E capacitados, se localiza en la zona acrosomal. TC se observa marcando el gangliósido GM1 en la zona postacrosomal luego de la capacitación (redistribución). En ensayos preliminares el gangliósido GM1 se localizó a nivel postacrosomal; siendo esta la zona de unión entre los ovocitos y los E durante la fertilización. Los resultados de FIV, sugieren que los componentes al redistribuirse tras la capacitación tienen un rol importante en la fertilización, pero aún no está del todo definido. En los primeros ensayos, si bien el bloqueo de los componentes de los MD produjo una disminución en la unión, estadísticamente no resultó significativo.

1057. (7020) DETECCIÓN DE RECEPTORES DE ÁCIDO GLUTÁMICO EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y ESPERMATOZOIDES DE RATÓN. SORIA, M.; SELTZER, A; y FORNÉS, M.

IHEM-FCM - UNCuyo - Mza. 5500. mformes@fcm.uncu.edu.ar

El Ácido Glutámico (Glu) es un neurotransmisor excitatorio. Su acción es mediada por receptores (Rc) de dos tipos: Ionotrópicos (AMPA/Kainico, NMDA) y Metabotrópicos (mGluRs) y actúa también en diversos órganos periféricos. Si bien los Rc no han sido descritos en espermatozoides (Esp), hemos informado previamente acciones del Glu en esta célula. El Glu promueve la reacción acrosomal (RA) en concentraciones µmolar. Utilizamos anticuerpos (ac) anti mGluR2/3 (que reconoce subunidades mGluR2 y mGluR3); mGluR5/1 (reconoce subunidades mGluR y mGluR1a) y pan-NMDA (NR1; para splice variants) y NMDAR 2C (que reconoce NMDAR2A y NMDAR2B) para localizar los Rc de Glu en homogenados de Esp de ratón por Western Blot. Como controles se utilizaron homogenados de Corteza Cerebral (CC), e Hipocampo (Hipo) de ratas. En los Esp, con el ac anti NMDAR2C se detectaron dos bandas de ~180 y ~50 KDa que coinciden en la CC e Hipo; aunque están ausentes una banda de ~220 KDa y otra de ~165 KDa presentes en el cerebro. El ac anti mGlu 2/3 detecta varias bandas de las cuales 3 coinciden con las expresadas en CC, de entre ~187 y 118 KDa con una banda intermedia, mientras que dos bandas, una de ~200 KDa y otra de ~50 KDa, no están presentes en los Esp. El ac anti mGluR 5/1 es expresado en CC e Hipo en dos bandas de ~150 (mGlu1) y ~85 (mGlu5) KDa y se repiten exactamente en los Esp. No se observaron bandas correspondientes a la subunidad NMDAR1 en los Esp, estando presente una banda de ~115 KDa en CC e Hipo. Mediante inmunocitoquímica se determinó una localización dorso-acrosomal para NMDA R2C y acrosomal para los de Glu. Conclusión: Se

demonstró la presencia de subunidades de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de Glu en Esp homogenizados y enteros. Esto apoya la idea de que los efectos del Glu sobre la reacción acrosomal serían específicos.

1058. (7025) EL ACIDO HIALURONICO INDUCE LA CAPACITACION Y REACCION ACROSOMAL EN EL ESPERMATOZOIDE BOVINO CRIOPRESERVADO. GUTNISKY, CYNTHIA; MORADO, SERGIO; TELLADO, MATIAS; DALVIT, GABRIEL; THOMPSON, JEREMY (1); BECONI, MARTHA; CETICA, PABLO

Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Reproductive Medicine Unit, TQEH, Adelaide University

Durante el proceso de maduración, la síntesis de ácido hialurónico (AH) en la matriz extracelular de los complejos ovocito-cumulus (COCs) bovinos podría participar en eventos asociados a la fecundación. El objetivo del trabajo fue determinar la influencia del AH sobre la capacitación (C) y reacción acrosomal (RA) en el espermatozoide bovino criopreservado. La C y RA fue evaluada utilizando el fluorocromo clorotetraciclina en muestras control, incubadas con heparina 10 U/ml (inductor de la capacitación) o AH 1mg/ml a los 0', 20', 40' y 60'. Además se estudió el efecto de la dosis (D) de AH sobre estos procesos (Ctrol: 0; D[1]: 0,25; D[2]: 0,5; y D[3]: 1 mg/ml). Para evaluar la influencia del AH en la fertilización in vitro (FIV), los COCs fueron recolectados de ovarios de vacas faenadas y madurados en medio 199, 5% suero fetal bovino, gonadotrofinas, DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucina, inhibidor de la síntesis de AH) por 22 hs a 39°C, 5% CO[2] en aire humidificado. La FIV fue realizada en SOFm con heparina o AH usando semen congelado en las mismas condiciones de cultivo. La heparina incrementó el porcentaje de C espermática a los 40' respecto a su control (53,0±2,9% vs. 28,5±2,1%; P<0,05) y el AH a los 20' respecto a su control (46,3±3,7% vs. 25,3±3,4%; P<0,05), pero solamente el AH indujo la RA a los 60' (43,8±3,8% vs. 7,5±2,5%; P<0,05). Este efecto inductor de la C (Ctrol: 21,6±2,8%; D[1]: 37,6±1,2%; D[2]: 41,6±0,4%; D[3]:47,2±1,9%) y la RA (Ctrol: 7,5±2,8%; D[1]: 19,4±2,7%; D[2]: 23,6±1,7%; D[3]:34,0±2,2%) del AH demostró ser dosis dependiente (P<0,05). En ovocitos madurados en presencia de DON el porcentaje de FIV (54,3%) disminuyó respecto al control (69,3%; P<0,05). Este efecto fue revertido por la heparina (78,4%) o AH (70,6%) en el medio de FIV (P<0,05). Los resultados demuestran que el AH induce tanto la C como la RA en el espermatozoide bovino criopreservado, desempeñando un papel importante en el proceso de fecundación del ovocito.

1059. (7027) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO DE OVOCITOS BOVINOS PROVENIENTES DE FOLÍCULOS DE DISTINTOS TAMAÑOS. RACEDO, SILVIA ELISA; SALAMONE, DANIEL

Laboratorio de Biotecnología Animal-Facultad de Agronomía-UBA

Las técnicas de clonación requieren una máxima disponibilidad de ovocitos para enucleación, transferencia nuclear y posterior activación. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de desarrollo de ovocitos provenientes de folículos de distintos tamaños luego de una activación partenogénica. Complejos ovocito-células del cúmulus (COC) se colectaron por punción y aspiración de folículos grandes (FG) (8-5mm); intermedios (FI) (4-2mm) y pequeños (FP) < 2mm, se seleccionaron. Todos los cultivos se realizaron en microgotas a 38,5 °C; 5% CO₂ y 100% de humedad. La maduración in vitro se realizó en medio TCM 199 con 5% de SFB; durante 22 hs. La activación fue inducida en todos los ovocitos por incubación con 5 mM ionomicina seguida del cultivo en 2 mM 6-DMAP, TCM 199 con 5% de SFB durante 3 hs. Los ovocitos fueron cocultivados con células del cúmulus en TCM-199 con 5% SFB, se evaluó el clivaje a las 48hs., número de mórulas y blastocistos a los 5 y 7 días de cultivo respectivamente. Los resultados se analizaron mediante Chi-

cuadrado. La tabla muestra el número de embriones clivados y a partir de éstos el número y los porcentajes de mórulas y blastocistos. Se observó un porcentaje de ovocitos clivados significativamente menor (p<0,05) en el grupo FP comparado con el grupo control FI, no habiendo diferencias en la producción de mórulas y blastocistos, a pesar de observarse una tendencia a disminuir la producción de blastocistos en este grupo.

Grupo	n	Clivados n (%)	Mórulas n (%)	Blastocistos n (%)
FG	101	45 (45)a	25 (55,5)	7 (15,5)
FI	216	113 (50)a	44 (39)	21 (18,6)
FP	109	44 (40)b	16 (36)	5 (11,4)

Es posible producir desarrollo embrionario luego de una activación partenogénica a partir de ovocitos provenientes de folículos pequeños pero con un porcentaje de clivaje menor.

1060. (7257) ACCIÓN DEL TNF-ALFA SOBRE LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE INHIBINAS EN TÚBULOS SEMINÍFEROS HUMANOS. ANDREONE, LUZ; PELLIZZARI, ELIANA H.; BERGADÁ, IGNACIO; CIGORRAGA, SELVA B.; VENARA, MARCELA; CHEMES, HECTOR; CAMPO, STELLA

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE).

Factores endocrinos y paracrinos participan en la regulación de la producción de inhibina en el testículo. Hemos demostrado previamente que durante el periodo postnatal las citoquinas ejercen una acción inhibitoria. El objetivo de este trabajo fue estudiar la regulación de la producción de inhibinas (Pro-alfa-C e inhibina B) en cultivos de túbulos seminíferos (TS) provenientes de un paciente de 13 años de edad con pseudohermafroditismo masculino. El estudio histopatológico del testículo reveló la presencia mayoritaria de células de Sertoli maduras en los TS. Las inhibinas se determinaron por ELISA. Los niveles de Pro-alfa-C e inhibina B en suero fueron: 1003.1 y < 16 pg/ml, respectivamente. Los TS se cultivaron durante 8 días, a partir del día 2 los cultivos fueron estimulados con: medio condicionado de células intersticiales, FSH, FSH + insulina; FSH +TGF-beta, activina A, TNF-alfa y testosterona. Los niveles de inhibinas en los medios condicionados se evaluaron a los 4, 6 y 8 días. La producción basal de ambas inhibinas se incrementó con los días de cultivo. La FSH estimuló debilmente la producción de Pro-alfa-C (510 ± 109 vs. 856 ± 168 pg/µg DNA). El TNF-alfa inhibió significativamente la producción de ambas inhibinas: Pro-alfa-C : 191 ± 98 pg/µg DNA, p<0.01; inhibina B: 353 ± 79 vs. 179 ± 40 pg/µg DNA, p<0.01. Este efecto fue más marcado para Pro-alfa-C y se acentuó durante el tiempo de cultivo. No se observaron variaciones en la producción de ambas inhibinas en el resto de las condiciones estudiadas. Estos resultados sugieren que, al iniciarse el desarrollo puberal, la célula de Sertoli madura es capaz de sintetizar inhibinas «in vitro» en ausencia de los factores estimulatorios producidos por las células germinales. El TNF-alfa ejercería una acción inhibitoria sobre la producción de inhibinas en el testículo, independientemente del grado de maduración de la gonada.

1061. (7472) CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS Y MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS. RITTA, MONICA; TARTAGLIONE, MABEL

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora

La capacidad fertilizante del espermatozoide, E, depende de cambios funcionales y estructurales que se producen durante su tránsito por el tracto reproductor femenino, denominados en su conjunto capacitación. La identificación de factores presentes en fluidos cervicales, uterinos y oviductales responsables de la inducción de capacitación permitiría el desarrollo de medios químicamente definidos a utilizar en técnicas de fertilización «in vitro». Entre estos factores, el GABA ha sido postulado como modulador putativo de la fun-

ción espermática. Al respecto, describimos la presencia de GABA y de receptores GABAérgicos en E humanos e inducción por GABA de hiperactividad. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la posible regulación GABAérgica de E bovinos y los mecanismos moleculares involucrados. Mediante una técnica de radioreceptor se determinó la presencia de GABA en semen (E, 0.064 ± 0.003 moles/10(6)cél; plasma seminal, 23.21 ± 1.16 nmoles/ml). El análisis de la asociación de (3)H-muscimol a membranas crudas de E reveló la existencia de una única población de sitios de unión para GABA tipo A ($K_d = 3.87$ nM, $B_{max} = 417$ fmol/mg prot). La concentración de AMPc, determinada por RIA, resultó incrementada por GABA en E incubados en presencia de $Ca(2+)$ 2.5 mM, efecto revertido por antagonistas del receptor GABAérgico tipo A. Por espectrofluorimetría se observó, en E cargados con Fura-2AM, el efecto estimulador de GABA 10 μ M sobre el flujo de $Ca(2+)$, que resultó revertido por el antagonista picrotoxina y no afectado por agonistas de receptores tipos A, B y C Cuando la capacitación se evaluó mediante la técnica fluorescente de clortetraciclina se observó un incremento dependiente de la dosis de GABA del porcentaje de E que presentaban el patrón B, correspondiente a E capacitados. Se puede concluir que el GABA desencadena una secuencia de eventos en el E bovino: activación de un receptor GABAérgico tipo A, aumento del flujo de calcio e incremento del contenido intracelular de AMPc, fenómenos que resultarían en la capacitación.

1062. (7474) CAPTACIÓN DE (3)H-GABA POR ESPERMATOZOIDES HUMANOS. RITTA, MONICA; TARTAGLIONE, MABEL

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora

En nuestro laboratorio estudiando la regulación GABAérgica del espermatozoide humano, E, demostramos la presencia de GABA en semen, el efecto de GABA sobre la motilidad y la existencia de receptores GABAérgicos en membranas de E frescos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar un posible sistema de transporte de (3)H-GABA como mecanismo responsable de la concentración del neurotransmisor en el E. Se evaluará la modulación de esta captación por GABA extracelular y por fosforilación en tirosina tal como ha sido descrito para otros transportadores. Asimismo, se evaluará la dependencia de este transporte de la condición fisiológica del E, esto es captación de GABA por gametas frescas, capacitadas o reaccionadas. El análisis cinético de la captación reveló valores de K_m y V_{max} de 1.13 μ M y 27.5 fmol/min/10(6) cél, respectivamente. La inhibición de la captación, expresada como porcentajes de (3)H-GABA captado (100%) resultó: ouabaína, 21 ± 2 ; β -alanina, 50 ± 1 ; L-DABA, 75 ± 3 ; ácido nipecótico, 62 ± 2 y tiagabina, 69 ± 1 . La preincubación de E con GABA resultó en una regulación positiva de la captación (GABA 100 μ M, 46.3 fmol/min/10(6) cél vs control, 24.8 fmol/min/10(6) cél., $p < 0.01$), efecto revertido por el inhibidor del transporte cerebral de GABA SKF89976A. La incubación de los EC, en presencia de genisteína (G), inhibidor de tirosina quinasas, determinó una disminución del transporte (3)H-GABA, no observado en presencia de daidzein, análogo inactivo de G. Aún más, la reducción del transporte inducida por G resultó revertida por pervanadato (inhibidor de tirosina fosfatasa). Cuando el transporte de GABA fue evaluado en E capacitados (EC), se observaron valores de captación total comparables a los de la unión no específica, por lo que la captación resultó prácticamente nula en EC, al igual que en E reaccionados. Los presentes resultados demuestran la existencia de un sistema de captación de GABA en E humanos, sujeto a regulación por GABA extracelular y por la fosforilación en tirosina y no detectable en E que han sufrido los cambios inherentes a la capacitación y a la reacción acrosomal.

1063. (7806) LA HEPARINA COMO ACEPTOR DE PROTAMINAS EN LA DESCONDENSACION NUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO. ROMANATO, MARINA (1); VITALE, ARTURO (2); REGUEIRA, ELEONORA (1);

CAMEO, MÓNICA (4); CALVO, LUCRECIA (1); CALVO, JUAN CARLOS (1,3)

(1) IBYME, (2) PROPLAME, Dpto. Qca. Orgánica, (3) Dpto. Qca. Biológica FCEyN UBA, (4) Biología de la Reproducción

Los espermatozoides humanos se descondensan in vitro en presencia de heparina (Hep) y glutatión (GSH). In vivo, dentro del ovocito, el espermatozoide tiene su núcleo expuesto. Estudios previos de nuestro laboratorio indican que in vitro la Hep descondensa núcleos aislados, que su actividad descondensante está relacionada con su sulfatación y que el heparán sulfato (HS), análogo estructural de la Hep, podría ser el agente descondensante in vivo. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) estudiar la importancia de los grupos sulfato para la actividad de Hep / HS y 2) comprobar que la Hep es capaz de desplazar a las protaminas de su asociación al ADN. 1) El análisis molecular por computadora de 4 unidades disacáridicas, para heparinas nativas, modificadas (desulfatadas, acetiladas y la combinación de ambos cambios) y heparán sulfato, demostró que los grupos sulfato son imprescindibles para la actividad, que cuanto más expuestos están y menos impedidos se encuentren, como en el caso de Hep nativa y HS, más activos son, así como también cuanto más en línea se hallen. 2) Se utilizaron muestras de donantes normospérmicos (OMS). Se aislaron los núcleos (SDS, sonificado y colchón de sacarosa) y se descondensaron (GSH 10 mM y Hep 46 μ M, 30' a 37° C; controles: Hep o GSH sólo). Se extrajeron las proteínas básicas nucleares mediante extracciones sucesivas con: 1) NaCl-Urea-mercaptoetanol, 2) HCl, 3) TCA. Las proteínas extraídas de núcleos descondensados y controles se analizaron mediante geles ácidos de poliácridamida. Se observó una marcada disminución en las bandas de protaminas P1 y P2 en las extracciones de núcleos descondensados con respecto al control. Concluimos que la Hep in vitro puede desplazar las protaminas de su asociación con el ADN, que la sulfatación de la molécula es fundamental para este proceso y proponemos que el HS, análogo estructural de la Hep, haría lo mismo in vivo.

PRESENTACIÓN ORAL DE TRABAJOS

PREMIO COSSIO MESA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

1064. INFECCIONES Y RIESGO DE DESARROLLO DE NUEVAS EXACERBACIONES EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE. CORREALE, JORGE; FIOL, MARCELA

Instituto de Investigaciones Neurológicas Raúl Carrea (FLENI)

Se estudiaron prospectivamente 50 pacientes con Esclerosis Múltiple (EM) a brotes y remisiones con la finalidad de evaluar el riesgo de nuevas exacerbaciones durante el curso de infecciones sistémicas. Los pacientes fueron evaluados neurológicamente durante un período medio de 20 meses utilizando el score EDSS. Las infecciones fueron confirmadas con serología o cultivo bacteriano. En 12 pacientes se realizaron estudios de RMN al momento de la primera consulta, 2 y 12 semanas post-infección. Células mononucleares (CMN) obtenidas al momento de la primera consulta, 2,5,12 y 24 semanas más tarde se estimularon con antígenos (Ag) virales o bacterianos específicos valorándose la producción de IFN-gamma, TNF-alpha, IL-12, IL-4 e IL-10 utilizando ELISPOT. Asimismo se estudiaron las concentraciones de MMP-2 y MMP-9 utilizando ELISA y la expresión de LFA-1 y VLA-4 por citometría de flujo. Durante el período de tiempo asociado a infecciones se verificó un significativo incremento en el desarrollo de nuevas exacerbaciones, las cuales fueron mas severas y prolongadas ($p < 0.0001$). Estos datos se correlacionaron con un incremento en el número de lesiones Gadolinium positivas en los estudios de RMN ($p < 0.0001$). La

estimulación de CMN con Ag virales específicos incrementó la producción de IL-12, IFN-gamma, TNF-alpha y MMP-9, así como la expresión de LFA-1 y VLA-4. En experimentos utilizando un sistema de trans-cámaras factores solubles producidos durante la estimulación viral de CMN aumentaron sólo parcialmente la proliferación de líneas celulares específicas para MBP[83-102] y MOG[63-87]. Por el contrario, la estimulación viral de CMN en presencia del Ag específico determinó la activación y expansión de células T autoreactivas con estímulos 20 veces menores que los habituales. Durante el curso de infecciones Ag específicos incrementan de manera significativa su actividad agonista. Estos hallazgos explican, al menos en parte, la mayor susceptibilidad de los pacientes con EM a desarrollar nuevas y más severas exacerbaciones durante estos períodos.

1065. GENÉTICA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA): PRESENLINA 2, APOLIPOPROTEÍNA E (APOE) Y NO SINTASA ENDOTELIAL (ECNOS). AZURMENDI, PABLO; LIBERCZUK, CYNTHIA; DOS RAMOS FARIAS, MARIA; GUERRA, DANISA; MELENDEZ, FLOR; BROCCA, SUSANA; SANTORO, PATRICIA; ARRIZURIETA, ELVIRA; BRUSCO, LUIS; MUCHNIK, CAROLINA

Laboratorio de Estudios Neurocognitivos y Enfermedad de Alzheimer, IDIM A. Lanari, Facultad de Medicina, UBA. Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UBA

La EA esporádica (EAE) es la forma de demencia más frecuente. Existen factores genéticos asociados a EAE, como APOE, y otros como ecNOS que aún no muestran resultados definitivos. Además un 5% de casos de EA es familiar (EAF), ocasionadas por mutaciones en genes como proteína precursora de amiloide y presenilinas 1 y 2 (PS1, PS2). Analizamos la existencia de una mutación en PS2, PS2N141I en una familia de ascendencia Volga-German, con EAF. Por otro lado estudiamos la influencia de polimorfismos de APOE y ecNOS como factores de riesgo de la EAE en nuestra población. Estudiamos pacientes con EA (n= 75), controles >60 años (C>60, n= 44) y <60 (C<60, n= 58) sin antecedentes neurológicos. APOE, ecNOSGlu298Asp y PS2N141I se determinaron con PCR-RFLP. Las frecuencias para APOE en EAE de alelo 4 (0.27) y genotipos 3/4-4/4 (0.42) está aumentada respecto a C>60 (0.09 y 0.13, p<0.003 respectivamente). La EAE está asociada con el alelo 4 [OR=3.7 (IC 95%: 1.6 a 8.7)] y con los genotipos 3/4-4/4 [OR=4.9 (1.7 a 13.8)] con p<0.003, respectivamente. El alelo 2 fue protector con respecto al alelo 4 [OR=4.88 (1.3 a 17.8), p<0.03]. El ecNOSGlu298Asp no muestra diferencia entre la poblaciones estudiadas, pero la frecuencia del genotipo Asp-Asp tendría a ser protector en EAE (f en EAE=0.02 vs C>60=0.11, p=0.08). En la familia estudiada, 4 pacientes con EAF de comienzo a los 53.5±1.9 años y 5 familiares sanos, de la familia estudiada, mostraron un RFLP compatible con la portación de PS2N141I y 1 familiar sano con RFLP normal. Testeando en pacientes EA con comienzo <60 (n=21) y 14 individuos sanos, no encontramos portadores de dicha mutación. La presencia del alelo 4 y/o genotipo 3/4 ó 4/4 está asociado al riesgo de padecer la EAE, así como ecNOS298Asp-Asp podría ser un indicador de protección. La presencia de la mutación PS2N141I sería la primera descrita en nuestro país.

1066. EVALUACIÓN DE UN ENFOQUE DE RIESGO PARA LA DETECCIÓN DE DIABETES GESTACIONAL EN ATENCIÓN PRIMARIA DE LA SALUD (APS). MCCARTHY, ANTONIO; APEZTEGUÍA, MARÍA; ETCHEVERRY, SUSANA; CASTIGLIONE, NICOLÁS; COSTA, DIEGO; CURCIARELLO, RENATA; FERNÁNDEZ, MARINA; GRAIEB, AUGUSTO; TORRES, MARÍA

Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

La diabetes gestacional (DG) es una de las patologías obstétricas más frecuentes. Se han descrito varios factores que

incrementan el riesgo para DG, algunos dependientes de la población en estudio. En este trabajo se realiza: a) pesquisa de DG según normas de la Sociedad Argentina de Diabetes, en todas las embarazadas que se asisten en centros de APS de La Plata; b) búsqueda de posibles factores de riesgo para DG a través de una encuesta personalizada; c) seguimiento post-parto de las gestantes con DG para evaluar posibles complicaciones perinatales. Hasta el presente se estudiaron 637 embarazadas, de las cuales 243 eran primerizas (PR) y 394 refirieron embarazos previos (EP), detectándose DG en 30 casos (4 por hiperglucemia en ayunas y 26 por intolerancia a la glucosa oral). La prevalencia de DG fue de 4,7% en la población total (Intervalo de Confianza: 3,1-6,3%), de 3,3% en PR (IC: 1,1-5,5%) y de 5,6% en EP (IC: 3,3-7,8%). De las variables analizadas a partir de las encuestas, se asociaron con un riesgo aumentado para DG: antecedentes de hiperglucemia (Odds Ratio: 8,1 p<0.0001); obesidad pregestacional (IMC>27) (OR: 2,8 p<0.02); y DG previa (OR: 8,0 p<0.002). Otras variables (edad>30 años, hipertensión en el 3er trimestre, origen paraguayo) parecieron incrementar el riesgo para DG, pero no alcanzaron significación estadística. En un 62% de las PR con DG, y en un 27% de las EP con DG, no se detectó ningún factor de riesgo previamente descrito en la literatura. Sobre 25 casos evaluados post-parto, se pudieron observar complicaciones perinatales no fatales tanto maternas (20%) como infantiles (32%), el 70% de las cuales se asociaron a un control obstétrico deficiente post-diagnóstico de DG. En el subsector público de La Plata, la preselección de embarazadas por factores de riesgo no es adecuada para detectar DG en primerizas, pero sí podría serlo en las gestantes con embarazos previos.

1067. IMPORTANCIA PRONÓSTICA DEL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD OSTEOGÉNICA DE LA CÉLULA ESTROMAL MESENCIMAL DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA. HOFER, EL; CARAMUTTI, D; BORDENAVE, RH; FELDMAN, L; CHASSEING, NA

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Hospital I. Iriarte; Fundación Favaloro

La célula madre mesenquimal o unidad formadora de colonia fibroblástica (CFU-F) y los progenitores estromales de médula ósea (MO) tienen un papel fundamental en la formación del hueso por su multipotencialidad para diferenciarse a osteoblastos. Previamente, encontramos una disminución del número de CFU-F y de la capacidad de confluencia de las células estromales mesenquimales (MSC) de MO en pacientes con cáncer de mama (PCM), libres de tratamiento; pudiendo representar un mecanismo no caracterizado, previo a la inhibición de la formación del hueso y osteólisis. Algunos líneas tumorales mamarios liberan factores solubles que inhiben la proliferación osteoblástica y estimulan la apoptosis de una línea estromal preosteoblástica. En base a lo anterior estudiamos, el potencial osteogénico de MSC de MO de PCM avanzado (libres de tratamiento, sin osteoporosis, ni metástasis, menopáusicas, n=7) y voluntarias sanas (VS, n=7). MSC fueron cultivadas en medio de diferenciación osteogénica (MDO). El análisis de la diferenciación osteogénica fue realizado con tinción de Von Kossa, evaluando morfología celular y formación de matriz de mineralización (MM) bajo los siguientes criterios; presencia de colonias y microcolonias, % de diferenciación (MSC distintas a la fusiforme) y grado de diferenciación (0=fibroblastos, 1=camino a osteoblasto, 2=osteoblasto, 3=osteocito). El 100% de VS y sólo 3/7 PCM tuvieron colonias y microcolonias. Las PCM presentaron 15±7% de células con características osteogénicas vs. 24±4% en VS. El 100% de VS respondieron al MDO, el 43% con grado 1 y el 57% grado 2-3. El 57% de PCM respondieron al MDO, 75% grado 1 y 25% grado 2-3. Las PCM presentaron una distribución de depósitos de calcio anárquica y una MM heterogénea en comparación a VS. Las MSC de MO de PCM mostraron una disminución o supresión del potencial osteogénico. Por lo tanto, este estudio podría ser considerado como un factor pronóstico representando el primer signo de futuros desórdenes óseos.

1068. ANÁLISIS MOLECULAR DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN LINFOMAS FOLICULARES. SU PARTICIPACIÓN EN LA PROGRESIÓN TUMORAL. COTTLIAR, ALEJANDRA S; NORIEGA, MARÍA F (1); NARBAITZ, MARINA (2); SLAVUTSKY, IRMA (1)

Departamentos de Genética (1) y Patología (2), Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina

Los telómeros son estructuras esenciales para el mantenimiento de la integridad cromosómica y la capacidad replicativa de la célula. La reducción de la longitud telomérica (LT) aumenta la probabilidad de producir errores capaces de generar cambios genómicos importantes para el desarrollo neoplásico, determinando desbalances de material genético. En este trabajo se evaluó la LT en médula ósea (MO) y/o biopsia ganglionar (G) de 36 pacientes (edad media: 54,2 años, rango 29-77 años; 21 varones): 29 con linfoma folicular (LF) al diagnóstico y 7 con linfoma B difuso a células grandes secundario a LF (LBDCG-S). La LT se evaluó mediante el análisis de los fragmentos de restricción terminal (TRF). Se efectuó el análisis del rearrreglo molecular del gen BCL2 por PCR anidada y de larga distancia. Las medias de TRF en LF ($4,18 \pm 0,18$ Kb) y LBDCG-S ($3,31 \pm 0,25$ Kb) resultaron menores que en controles ($8,50 \pm 0,50$ Kb) ($p < 0,001$), encontrándose diferencias significativas entre ambos subtipos histológicos ($p = 0,036$). Asimismo, las muestras positivas para el rearrreglo BCL-2 mostraron LT mayores ($4,25 \pm 0,19$ Kb) que las negativas ($3,39 \pm 0,30$ Kb) ($p = 0,023$), observándose una tendencia a presentar valores menores en pacientes negativos para el rearrreglo, intermedios en positivos para mcr ($3,84 \pm 0,45$ Kb) y mayores en los positivos para MBR ($4,35 \pm 0,21$ Kb). Nuestros resultados muestran una reducción de la LT en LF y LBDCG-S, con TRFs significativamente más cortos en estos últimos, sugiriendo la participación del acortamiento telomérico en la progresión tumoral. Asimismo, las diferencias detectadas entre los casos BCL-2 positivos y negativos sustentarían la presencia de diferentes mecanismos patogénicos propuestos para estos distintos LF.

1069. ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO G-308A EN EL PROMOTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNFA) CON COMPONENTES DEL SÍNDROME METABÓLICO. SOOKOIAN, SILVIA; GEMMA, CAROLINA; FERNÁNDEZ GIANOTTI, TOMÁS; GARCÍA, SILVIA I; GONZÁLEZ, CLAUDIO; PIROLA, CARLOS J

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari

El gen del TNFa se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y la variante del promotor, G-308A se asoció con aumento de la transcripción del gen así como de los niveles circulantes del TNFa. Nosotros evaluamos el papel de dicho polimorfismo en el síndrome metabólico realizando un meta-análisis. Veinte estudios fueron incluidos, mostrando mayor presión arterial sistólica (PAS) (D:0.139, IC 95% 0.022-0.256, $p < 0,02$, en un total de 413 individuos), mayores niveles plasmáticos de la insulina (D: 0.11, IC 95% 0.038-0.194, $p < 0,004$, n: 2999), mayores valores en el índice HOMA (D: 0.26, IC 95% 0.036-0.48, $p < 0,023$, n 362) así como una asociación con la obesidad (OR:1.25, IC 95% 1.06-1.49, $p < 0,008$, n: 3119) en los portadores el alelo A. En función de estos datos, y ante la falta de evidencias en población adolescente, decidimos abordar el estudio de la relación entre la variante del gen y el síndrome metabólico en una población de 175 adolescentes, en quienes se analizaron en función de los genotipos del G-308A TNFa los componentes del síndrome metabólico. Encontramos que la PAS normalizada por sexo y edad es más elevada en los portadores del alelo A que en los homocigotas GG ($1,3 \pm 1,8$ vs $0,5 \pm 1,7$, $p < 0,01$). Finalmente, como en el meta-análisis, el índice HOMA fue mayor en los portadores del alelo A ($2,9 \pm 1,4$) respecto de los sujetos GG ($2,6 \pm 1,7$), $p < 0,04$. Por lo tanto concluimos, que en población adolescente así como lo reportado en adultos, la variante G-308A del TNFa se asocia tanto con el aumento de la presión arterial sistólica como con la resistencia a la insulina. Además, este es el primer

meta-análisis de la literatura que resuelve la controversia acerca del papel de la variante del promotor del G-308A TNFa en la patogénesis del síndrome metabólico. Finalmente, ambas evidencias sugieren que el TNFa está asociado a componentes del síndrome metabólico como obesidad, insulino-resistencia y elevación de PAS.

**PREMIO «CHERNY»
MESA INTERDISCIPLINARIA**

1070. INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASAS LEUCOCITARIA (SLPI): ¿OTRO FACTOR INVOLUCRADO EN LOS MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL?. COSTA, MARÍA JULIETA; GUERRIERI, DIEGO; REITIERI, ROMINA MACARENA; TATEOSIAN, NANCY; AMIANO, NICOLÁS; BARBOZA, MARCOS; MAFFIA, PAULO; CHULUYAN, EDUARDO

Laboratorio de Inmunogenética, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA

El inhibidor secretorio de proteasa leucocitaria (SLPI) es una proteína de 11,7 Kda, perteneciente a la familia de las antileucoproteasas, producido por células epiteliales y con actividad anti-inflamatoria. Recientemente se ha descrito una correlación entre los niveles séricos de SLPI y la malignidad de ciertos tumores. Otros estudios indican que el SLPI actúa directamente sobre las células tumorales aumentando el potencial metastásico de las mismas. El objetivo de este trabajo fue examinar la posible participación del SLPI en algunos de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune anti-tumoral. En primera instancia, evaluamos la capacidad del SLPI de inhibir la proliferación de linfocitos T (LT) inducida por células presentadoras de antígenos alogénicas. La presencia de rhSLPI disminuyó ($50 \pm 12\%$) la proliferación de LT alogénicos. Este efecto no se debió a la inducción de apoptosis por rhSLPI. Sin embargo, el tratamiento de las células dendríticas y células epiteliales HeLa con rhSLPI provocó una marcada disminución (30-40%) en la expresión de las MHC de clase I. Además se observó una disminución en la expresión de CD54 (ICAM-1), pero no en CD29 ($\beta 1$ integrina) en células HeLa. Citoquinas pertenecientes a perfiles Th1 (IFN gamma) y Th2 (IL-4) fueron capaces de modular la producción de SLPI en las células HeLa. De tal manera que IFN gamma disminuyó (50-60%), en tanto que IL-4 aumentó (40-50%) la producción de SLPI. Estos resultados sugieren que el SLPI evitaría la respuesta inmune antitumoral mediado por los linfocitos T CD8 al disminuir la expresión de MHC de clase I y al impedir una correcta interacción célula-célula la cual depende en parte por la unión entre CD54 y LFA-1.

1071. EFECTO CITOTÓXICO DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 Y SU SUBUNIDAD B EN CÉLULAS EPITELIALES TUBULARES RENALES HUMANAS EN CULTIVO. PISTONE CREYDT, VIRGINIA; NUÑEZ, PABLO; ZOTTA, ELSA; IBARRA, CRISTINA

Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA

Las bacterias E.coli enterohemorrágica productoras de toxina Shiga (Stx) pueden causar diarrea acuosa y/o hemorrágica, y síndrome urémico hemolítico (SUH). En Argentina, el SUH es la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños. El objetivo de este trabajo fue estudiar la toxicidad de Stx tipo 2 (Stx2) y su subunidad B (Stx2B) en células epiteliales tubulares renales humanas en cultivo (CERH), en presencia y ausencia de factores inflamatorios. Los efectos citotóxicos se evaluaron sobre: 1) la funcionalidad epitelial medida por la inhibición de la absorción de agua; 2) la viabilidad celular por incorporación de rojo neutro, 3) la inhibición de síntesis de proteínas por incorporación de (32)S-metionina, 4) el daño celular por observación al microscopio óptico y 5) la apoptosis celular por fragmentación de ADN

y captación de yoduro de propidio en citometría de flujo. Las células se extrajeron de corteza renal humana proveniente de nefrectomías realizadas en pacientes adultos en el Hospital de Clínicas. Los resultados muestran que la incubación de las CERH con 0,01 y 1ng/ml de Stx2 producen una inhibición de la absorción de agua a 1h de incubación no alterando la viabilidad celular. A tiempos mayores, hasta 72hs, reducen la viabilidad. Stx2B también modifica la viabilidad celular de una manera dosis y tiempo dependiente. La DC50 obtenida de la incorporación de rojo neutro a 72hs de incubación fue 1ng/ml para Stx2 y 10µg/ml para Stx2B. Las mismas dosis de Stx2 y Stx2B inhiben la síntesis de proteínas en 90% y 50%, respectivamente, y producen un 50% de apoptosis celular. Los efectos citotóxicos de Stx2 y Stx2B fueron potenciados por LPS (1µg/ml), IL-1β (1ng/ml) y butirato (2mM) pero no por TNF (1ng/ml), IL-6 (10ng/ml) e IL-8 (10ng/ml). En conclusión, nosotros demostramos que Stx2 y Stx2B modifica la funcionalidad y viabilidad celular de las CERH y que algunos factores inflamatorios pueden potenciar dicho efecto.

1072. EXPRESIÓN DEL SISTEMA DE IGFS, AROMATASA (ARO), RECEPTOR DE ESTROGENOS (ER) EN TEJIDO ADRENAL HUMANO (TAH) EN FUNCIÓN DE LA EDAD. IMPLICANCIAS EN LA ADRENRARCA. BAQUEDANO, MARÍA SONIA; SARACO, NORA; BERENSZTEIN, ESPERANZA; DAVILA, MARIA TG; RIVAROLA, MARCO; BELGOROSKY, ALICIA

Hospital de Pediatría Garrahan

Los factores que controlan la adrenergia, la diferenciación de la zona reticularis (ZR) y la secreción de andrógenos por la glándula adrenal humana no están totalmente esclarecidos. El objetivo fue evaluar el rol de los IGFs y los estrógenos (E) en la proliferación y/o diferenciación de la ZR. Los TAH (n=41) se dividieron en 3 grupos (Gr) etarios: Gr1, < 3 meses (n=12), período de involución de zona fetal (ZFe); Gr2, 3 meses-6 años (n=17), preadrenarca y Gr3 >6-20 años (n=12), adrenergia y postadrenarca. El índice de proliferación celular (%células Ki67+) (IPC) fue mayor (p<0.05) en zona glomerulosa (ZG) que en zona fasciculata (ZF) en los 3 Gr y que en ZFe (Gr1) y ZR (Gr3). El índice apoptótico (IA) (Tunel) fue similar en Gr2 y 3 y mas bajo en Gr1 y no hubo diferencias entre zonas excepto por un mayor IA en la ZFe en regresión. Por RT-PCR semicuantitativa y Northern blot, la abundancia del ARNm de IGF-1 y IGF-R1 fue similar en Gr1 y Gr3; el IGF-1 fue más alto y el IGF-R1 más bajo en Gr2 (p<0.05); el IGF-2 fue mayor en Gr1. No hubo diferencias entre Gr2 y Gr3 sugiriendo que el IGF-2 no estaría implicado en la adrenergia. El ARNm de ARO fue mayor en Gr 3 que en Gr1 y Gr2 (p<0.05). Por inmunohistoquímica se observó alta expresión de IGF-1 e IGF-R1 en ZG y ZF en los 3 Gr, si bien para IGF-R1 la señal más intensa se localizó en ZG. Se detectó una fuerte señal para ARO en medula adrenal (M) de los 3 Gr. La expresión del ERβ estuvo restringida a ZR de Gr3 y a ZFe de Gr1, mientras que no se detectó ERα en ningún grupo. Finalmente: 1) Dado que el mayor IPC, y no el IA, se detectó en la periferia colocalizando con el IGF-R1; el IGF-1, por vía autócrina, parácrina o endócrina, podría estar involucrado en la proliferación y migración de células adrenales progenitoras participando en el proceso de zonación postnatal. 2) Los E, producidos localmente en la M, jugarían un rol en la diferenciación de la ZR.

1073. ACIL-COA TIOESTERASA MITOCONDRIAL I (MTE-I) Y ACIL-COA SINTETASA 4 (ACS4) COMO COMPONENTES DE UN NUEVO CAMINO DE LIBERACIÓN DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO OBLIGATORIO EN LA REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS. MALOBERTI, PAULA; CASTILLA, ROCÍO; CASTILLO, FERNANDA; DUARTE, ALEJANDRA; ISABEL, NEUMAN; CORNEJO MACIEL, FABIANA; PAZ, CRISTINA; PODESTÁ, ERNESTO J.

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

El ácido araquidónico (AA) y sus derivados leucotrienos cumplen un rol fundamental en la regulación hormonal de la esteroidogénesis a través de la inducción de la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein). Esta proteína facilita el acceso de colesterol a la membrana mitocondrial interna, paso limitante de la esteroidogénesis. Sin embargo el mecanismo de liberación de AA que interviene es desconocido. El objetivo de este trabajo fue establecer el rol en este mecanismo de MTE-I, aislada y caracterizada en nuestro laboratorio, y de ACS4 que utiliza preferentemente AA como sustrato. La disminución de los niveles de MTE-I (69 ± 6%) producida por la transfección de la secuencia ADNc antisentido redujo la síntesis de esteroides estimulada por AMPc en células de Leydig de la línea MA-10 (70 ± 1.3%, P<0.001). El mismo efecto se observó cuando las células fueron transfectadas con ARN de interferencia específicos para MTE-I o ACS4. En ambos casos el efecto inhibitorio fue revertido por el agregado de AA exógeno. La sobreexpresión de MTE-I (78 ± 20%) incrementó la estimulación de la esteroidogénesis por AMPc (P<0.001). Ninguno de los tratamientos descriptos afectó la síntesis de esteroides inducida por un análogo del colesterol que atraviesa la membrana mitocondrial interna, ni tampoco la viabilidad celular. La disminución de la expresión de MTE-I también redujo la expresión de StAR promovida por AMPc (56 ± 14%). Estos resultados demuestran que las enzimas MTE-I/ACS4 son componentes obligatorios de un nuevo sistema de liberación de AA en la regulación de la esteroidogénesis. Este sistema no estaría restringido a la esteroidogénesis dado que previamente demostramos que MTE-I se expresa en otros tejidos y en corazón es activada por acción de agonistas beta adrenérgicos.

1074. EL ANÁLISIS POR cDNA ARRAY DE DOS LÍNEAS OLIGODENDROGLIALES QUE SOBREPRESAN TRANSFERRINA MUESTRA UN PERFIL GÉNICO DE MADURACIÓN DIFERENTE. GARCIA, CORINA; PAEZ, PABLO; PASQUINI, JUANA; SOTO, EDUARDO

Departamento de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET; Buenos Aires, Argentina

En el SNC la transferrina (Tf) es producida por los oligodendrocitos (OLG) y es esencial para su supervivencia. Recientemente demostramos que la apotransferrina (aTf) promueve la diferenciación de dos líneas oligodendrogiales (OLG), N19 y N20.1 (Paez y col 2004), que representan estadios diferentes en la maduración del OLG (Verity y col 1993). Se obtuvieron clones estables de ambas líneas que sobreexpresan Tf humana (Tfh), los cuales fueron utilizados para estudiar los genes involucrados en el efecto maduracional producido por esta proteína por ensayos de cDNA array. Las células fueron cultivadas durante 7 días a 39°C (temperatura diferenciante) y se aisló RNA total para el ensayo. En las células menos maduras (N19) sobreexpresando Tf encontramos un aumento significativo en enzimas claves del metabolismo de los neuroesteroides: 3β-HSD, que interviene en la síntesis de progesterona a partir de pregnenolona, y 5α-reductasa tipo 1, que convierte la progesterona en 5α-dihidroprogesterona. Estudios recientes demuestran un papel muy importante de la progesterona en la maduración de los OLG (Gago y col 2001). En la línea celular N20.1 (más madura) encontramos que la sobreexpresión de Tf produjo la inducción de varias subunidades del receptor GABA[A], las cuales participan en la regulación de MBP mediada por la progesterona (Ghoumari y col 2003) y en la interacción axón-glia (Lin y Bergles 2004). Además, en ambas líneas la sobreexpresión de Tf, produjo un aumento en la expresión de varios genes relacionados con la función mitocondrial y el metabolismo de lípidos complejos, pasos cruciales en la síntesis de mielina. En resumen, la sobreexpresión de Tf humana indujo la diferenciación de ambas líneas celulares modulando diferentes genes dependiendo del estado maduracional del OLG.

1075. PROGRESION DE LA INFECCION EXPERIMENTAL DE CEPAS ALTAMENTE ONCOGÉNICAS Y POCAMENTE ONCOGENICAS DEL VIRUS POLIOMA MURINO.
OTERO, JAVIER A.; SANJUAN, NORBERTO A

Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. UBA

El virus polioma murino tiene cepas altamente oncogénicas y otras que no producen neoplasias y se ha propuesto que la diferencia entre ambas está en la capacidad de las primeras para replicar en los tejidos. Para probar esta hipótesis, en este trabajo se estudió detalladamente la migración del virus desde su inoculación hasta la aparición de neoplasias, empleando la cepa altamente oncogénica A2 y la no oncogénica RA. Se inocularon diferentes grupos de ratones neonatos C3H BiDa con 5×10^5 ufp de cada cepa viral y otro grupo fue empleado como control. A los 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 40, 55, 70 y 150 días post-infección (pi) se sacrificaron grupos de ratones y la presencia del virus fue detectada por inmunoperoxidasa, histología, western blot y aislamiento

de partículas virales de los tejidos, mientras que la viremia y la viruria se evaluaron por dot blot. Se encontró que la cepa A2 replica a los 5 días pi en la médula ósea y el cartílago esternal y posteriormente compromete fibroblastos dérmicos, células canaliculares hepáticas, células alveolares del pulmón, ductos mamarios y parotídeos y, a partir de los 10 días pi y hasta la aparición de las neoplasias, infecta células tubulares renales. Se detectó además viremia desde el día 7 pi y viruria sostenida desde el día 10 pi en adelante. La cepa RA infecta el cartílago y la médula ósea a partir del día 5 pi y el riñón a partir del día 10 pi, no detectándose viremia y sí viruria a partir del día 10 pi. Las neoplasias inducidas por A2 presentan antígenos de la cápside, pero no se hallaron virus infectivos por cultivo de los homogenatos en monocapas de células permisivas NIH-3T3. Los resultados indican que no existe una relación directa entre la capacidad de replicación de polioma y la inducción de neoplasias, y que la presencia de antígenos estructurales del virus en las neoplasias no indica la existencia de virus infectivos en las mismas. Esto sugiere que el virus polioma tiene factores de oncogenicidad que son independientes de los factores de replicación.